

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

### DECLARATION OF NON-ESTABLISHMENT OF INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 17(2)(a) and Rule 39)

Applicant's or agent's file reference PZ007PCT	IMPORTANT DECLARATION	Date of mailing (day/month/year) <b>14 OCT 1998</b>
International application No. PCT/US98/11422	International filing date (day/month/year) 04 JUNE 1998	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 06 JUNE 1997
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC Please See Continuation Sheet.		
Applicant HUMAN GENOME SCIENCES, INC.		

This International Searching Authority hereby declares, according to Article 17(2)(a), that no international search report will be established on the international application for the reasons indicated below.

1. ☐ The subject matter of the international application relates to:
  - a. ☐ scientific theories.
  - b. ☐ mathematical theories.
  - c. ☐ plant varieties.
  - d. ☐ animal varieties.
  - e. ☐ essentially biological processes for the production of plants and animals, other than microbiological processes and the products of such processes.
  - f. ☐ schemes, rules or methods of doing business.
  - g. ☐ schemes, rules or methods of performing purely mental acts.
  - h. ☐ schemes, rules or methods of playing games.
  - i. ☐ methods for treatment of the human body by surgery or therapy.
  - j. ☐ methods for treatment of the animal body by surgery or therapy.
  - k. ☐ diagnostic methods practiced on the human or animal body.
  - l. ☐ mere presentations of information.
  - m. ☐ computer programs for which this International Searching Authority is not equipped to search prior art.
  
2. ☐ The failure of the following parts of the international application to comply with prescribed requirements prevents a meaningful search from being carried out:
 

☐ the description
 ☐ the claims
 ☐ the drawings
  
3. ☒ The failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the prescribed requirements prevents a meaningful search from being carried out:
 

☒ it does not comply with the prescribed standard  
☒ it is not in the prescribed machine readable form
  
4. Further comments:  
Please See Continuation Sheet.

Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231	Authorized officer  BRIAN R. STANTON
Facsimile No. (703) 305-3230	Telephone No. (703) 308-0196

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**DECLARATION OF NON-ESTABLISHMENT OF  
INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/US98/11422

The International Patent Classification (IPC) or National Classification and IPC are as listed below:

IPC(6): A01N 37/18, 43/04; C12Q 1/00, 1/02, 1/68; C12N 5/00, 5/06, 15/00, 15/06, 15/09, 15/10, 15/11; G01N 33/53

US CL.: 435, 4, 7.1, 69.1, 70.1, 71.1, 172.3, 243, 320.1, 325, 410; 514/2, 44; 530/350, 387.1

**4. Further Comments (Continued):**

Applicant has not responded to the invitation to pay additional fees mailed on 04 August 1998. Therefore, the search would be conducted on the first appearing invention which includes claims 1-10, 14, and 15 in so far as these claims are drawn to the first ten (10) appearing nucleotide sequences. However, no meaningful search could be carried out on these sequences because the CRF that was received for this case on 15 June 1998 was technically defective and could not be used to conduct a search of the prior art.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

特 許 協 力 条 約

PCT


国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)

[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 661641	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P99/06476	国際出願日 (日.月.年) 19.11.99	優先日 (日.月.年) 20.11.98
国際特許分類(IPC) Int. Cl <sup>7</sup> C12N15/12, 9/64, 5/06, 1/21, C07K16/40, C12P21/08, A01K67/027, G01N33/543		
出願人(氏名又は名称) 扶桑薬品工業株式会社		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。  
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
  - ☒ 国際予備審査報告の基礎
  - ☐ 優先権
  - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
  - ☐ 発明の単一性の欠如
  - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
  - ☒ ある種の引用文献
  - ☐ 国際出願の不備
  - ☒ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 07.06.00	国際予備審査報告を作成した日 19.02.01	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 鈴木 恵理子 	4 B 9838
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- |                                     |                |                       |
|-------------------------------------|----------------|-----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ ページ、   | 出願時に提出されたもの           |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ ページ、   | _____ 付の書簡と共に提出されたもの  |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ 項、     | 出願時に提出されたもの           |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ 項、     | PCT 19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ 項、     | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ 項、     | _____ 付の書簡と共に提出されたもの  |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ ページ/図、 | 出願時に提出されたもの           |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの  |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、   | 出願時に提出されたもの           |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、   | _____ 付の書簡と共に提出されたもの  |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-41	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲	38, 40-41	有
	請求の範囲	1-37, 39	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-41	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1 : Biochimica et Biophysica Acta, 1399, Aug. 20, 1998  
Shigetaka Yoshida et al., "cDNA cloning and expression of a novel serine protease, TLSP", p. 225-228

文献2 : WO, 98/32865, A1 (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.)  
30. 7月. 1998 (30. 07. 98)

請求の範囲1-36

文献1には、ヒト海馬由来のセリンプロテアーゼをコードする遺伝子のDNA配列、文献2には、前立腺に関連するヒトカリクレインをコードする遺伝子のDNA配列、が記載されている。また、ある酵素のDNA配列が公知であるとき、該酵素の類縁体を取得することを目的に、該酵素のDNA配列をもとにプライマーあるいはプローブを設計、DNAライブラリから該酵素をコードする遺伝子を得ることは周知技術である。そうすると、文献1に記載されたセリンプロテアーゼまたは文献2に記載されたカリクレインに上記周知技術を適用し類縁体をコードする遺伝子を得ることは当業者にとって自明である。また、得られた遺伝子に周知の遺伝子工学的手法を適用し、該遺伝子がコードする酵素を得ること、該酵素に対するモノクローナル抗体を得ること、該抗体を周知の免疫測定法に用いること等も当業者にとって自明のことである。そして、請求の範囲1-36に記載された発明が文献1又は2から予測される以上の格別の効果を奏するものとも認められない。したがって、請求の範囲1-36に記載された発明は進歩性を有さない。

請求の範囲37、39

文献2には、前立腺の癌マーカーとして使えることが示唆されている。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## VI. ある種の引用文献

## 1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
WO, 99/49055, A1 「E, X」	30. 09. 99	17. 03. 99	20. 03. 98
WO, 98/54963, A2 「E, X」	10. 12. 98	04. 06. 98	06. 06. 97
WO, 99/31236, A2 「E, X」	24. 06. 99	17. 12. 98	17. 12. 97

## 2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)
-----------------	------------------------------	--

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## VII. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

請求の範囲 37-41 に記載された診断マーカーについて、明細書中には本願発明の B S S P 6 が実際に請求の範囲 37-41 に記載されている疾病の診断マーカーとして用いることができた実施例等の具体的な記載が全くなく、他の明細書及び技術常識を考慮しても、該診断マーカーが本願の明細書によって十分に裏付けられているものとは認められない。したがって、請求の範囲 37-41 は明細書により十分な裏付けをされていないものである。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06476

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, 9/64, 5/06, 1/21, C07K16/40,  
C12P21/08, A01K67/027, G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00-15/90, C12N9/00-9/99

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GENBANK/EMBL/DDBJ/GENESEQ  
SWISSPROT/PIR/GENESEQ  
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Biochimica et Biophysica Acta, 1399, Aug. 20, 1998 Shigetaka Yoshida et al., "cDNA cloning and expression of a novel serine protease, TLSP", p. 225-228	1-12, 17, 18, 20-23, 25-36 13-16, 19, 24, 37 -41
X A	WO, 98/32865, A1 (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.), 30 July, 1998 (30.07.98), Full text; Figs. 1 to 5 & AU, 9860419, A & US, 5840871, A	1-12, 17, 18, 20-23, 25-37, 39 13-16, 19, 24, 38 , 40, 41
P, X P, A	WO, 99/49055, A1 (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.), 30 September, 1999 (30.09.99), Full text; Figs. 1 to 3 (Family: none)	1-12, 17, 18, 20-23, 25-36 13-16, 19, 24, 37 -41
P, X P, A	WO, 98/54963, A2 (HUMAN GENOME SCI. INC.), 10 December, 1998 (10.12.98), p. 145-146, 441-442 & AU, 9878120, A	1-12, 17, 18, 20-23, 25-36 13-16, 19, 24, 37 -41

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing  
date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means

"P" document published prior to the international filing date but later  
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or  
priority date and not in conflict with the application but cited to  
understand the principle or theory underlying the invention  
document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such  
combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
15 February, 2000 (15.02.00)

Date of mailing of the international search report  
07 March, 2000 (07.03.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06476

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X P, A	WO, 99/31236, A2 (GENSET.), 24 January, 1999 (24.01.99), p.412-413 & AU, 9915030, A	1-12, 17, 18, 20-23, 25-36 13-16, 19, 24, 37 -41
A	The Journal of Neuroscience, 15(7), July 1995 Zu-lin Chen et al., "Expression and activity-dependent changes of a novel limbic-serine protease gene in the hippocampus", p.5088-5097	1-41
A	Gene, 213, June 15, 1998 Shigetaka Yoshida et al., "Sequence analysis and expression of human neuropsin cDNA and gene", p.9-16	1-41

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



<b>(51) 国際特許分類7</b> C12N 15/12, 9/64, 5/06, 1/21, C07K 16/40, C12P 21/08, A01K 67/027, G01N 33/543	-A1	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO00/31257</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 2000年6月2日(02.06.00)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP99/06476 <b>(22) 国際出願日</b> 1999年11月19日(19.11.99) <b>(30) 優先権データ</b> 特願平10/347802 1998年11月20日(20.11.98) JP <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 扶桑薬品工業株式会社 (FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.)(JP/JP) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号 Osaka, (JP) <b>(72) 発明者 ; および</b> <b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b> 植村英俊(UEMURA, Hidetoshi)(JP/JP) 〒664-0883 兵庫県伊丹市南鈴原3丁目133 Hyogo, (JP) 奥井 文(OKUI, Akira)(JP/JP) 〒639-1123 奈良県大和郡山市筒井町569-1 コーポ睦603号 Nara, (JP) 小南勝也(KOMINAMI, Katsuya)(JP/JP) 〒599-0212 大阪府阪南市自然田786-2 Osaka, (JP) 山口 希(YAMAGUCHI, Nozomi)(JP/JP) 〒603-8146 京都府京都市北区鞍馬口通り寺町西入ル 新御壺口町285-79 Kyoto, (JP)		<b>(74) 代理人</b> 三井真一(MITSUI, Shinichi)(JP/JP) 〒606-8267 京都府京都市左京区北白川西町86 北白川コーポラス202号 Kyoto, (JP) 青山 葆, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)  <b>(81) 指定国</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)  添付公開書類 国際調査報告書
<b>(54)Title: NOVEL SERINE PROTEASE BSSP6</b> <b>(54)発明の名称 新規セリンプロテアーゼBSSP6</b>  <b>(57) Abstract</b> Proteins having the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 2, 4 and 6 and proteins derived from these proteins by deletion, substitution or addition of one or several amino acids in these amino acid sequences; base sequences encoding these proteins; a transgenic non-human animal having an altered BSSP6 expression level; an antibody against BSSP6; and a method for detecting BSSP6 in a specimen by using this antibody.		

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 02 MAR 2001

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 661641	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/06476	国際出願日 (日.月.年) 19.11.99	優先日 (日.月.年) 20.11.98
国際特許分類(IPC) Int. Cl <sup>7</sup> C12N15/12, 9/64, 5/06, 1/21, C07K16/40, C12P21/08, A01K67/027, G01N33/543		
出願人(氏名又は名称) 扶桑薬品工業株式会社		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。  
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で \_\_\_\_\_ ページである。

- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。  
I ☒ 国際予備審査報告の基礎  
II ☐ 優先権  
III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成  
IV ☐ 発明の単一性の欠如  
V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明  
VI ☒ ある種の引用文献  
VII ☐ 国際出願の不備  
VIII ☒ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 07.06.00	国際予備審査報告を作成した日 19.02.01	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 鈴木 恵理子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 9838

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- |                                     |         |        |                      |
|-------------------------------------|---------|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 付の書簡と共に提出されたもの       |
|                                     |         |        |                      |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 付の書簡と共に提出されたもの       |
|                                     |         |        |                      |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 付の書簡と共に提出されたもの       |
|                                     |         |        |                      |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 付の書簡と共に提出されたもの       |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-41

有

請求の範囲

無

進歩性(I S)

請求の範囲

38, 40-41

有

請求の範囲

1-37, 39

無

産業上の利用可能性(I A)

請求の範囲

1-41

有

請求の範囲

無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: Biochimica et Biophysica Acta, 1399, Aug. 20, 1998  
Shigetaka Yoshida et al., "cDNA cloning and expression of a novel serine protease, TLSP", p. 225-228

文献2: WO, 98/32865, A1 (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.)  
30. 7月. 1998 (30. 07. 98)

## 請求の範囲1-36

文献1には、ヒト海馬由来のセリンプロテアーゼをコードする遺伝子のDNA配列、文献2には、前立腺に関連するヒトカリクレインをコードする遺伝子のDNA配列が記載されている。また、ある酵素のDNA配列が公知であるとき、該酵素の類縁体を取得することを目的に、該酵素のDNA配列をもとにプライマーあるいはプローブを設計、DNAライブラリから該酵素をコードする遺伝子を得ることは周知技術である。そうすると、文献1に記載されたセリンプロテアーゼまたは文献2に記載されたカリクレインに上記周知技術を適用し類縁体をコードする遺伝子を得ることは当業者にとって自明である。また、得られた遺伝子に周知の遺伝子工学的手法を適用し、該遺伝子がコードする酵素を得ること、該酵素に対するモノクローナル抗体を得ること、該抗体を周知の免疫測定法に用いること等も当業者にとって自明のことである。そして、請求の範囲1-36に記載された発明が文献1又は2から予測される以上の格別の効果を奏するものとも認められない。したがって、請求の範囲1-36に記載された発明は進歩性を有さない。

## 請求の範囲37、39

文献2には、前立腺の癌マーカーとして使えることが示唆されている。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## VI. ある種の引用文献

## 1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
WO, 99/49055, A1 「E, X」	30. 09. 99	17. 03. 99	20. 03. 98
WO, 98/54963, A2 「E, X」	10. 12. 98	04. 06. 98	06. 06. 97
WO, 99/31236, A2 「E, X」	24. 06. 99	17. 12. 98	17. 12. 97

## 2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)
-----------------	------------------------------	--

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## VII. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

請求の範囲 37-41 に記載された診断マーカーについて、明細書中には本願発明の B S S P 6 が実際に請求の範囲 37-41 に記載されている疾病の診断マーカーとして用いることができた実施例等の具体的な記載が全くなく、他の明細書及び技術常識を考慮しても、該診断マーカーが本願の明細書によって十分に裏付けられているものとは認められない。したがって、請求の範囲 37-41 は明細書により十分な裏付けをされていないものである。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

1201

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

訂正版

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2000 年 6 月 2 日 (02.06.2000)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 00/31257 A1(51) 国際特許分類: C12N 15/12, 9/64, 5/06, 1/21, C07K  
16/40, C12P 21/08, A01K 67/027, G01N 33/543

(21) 国際出願番号: PCT/JP99/06476

(22) 国際出願日: 1999 年 11 月 19 日 (19.11.1999)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願平 10/347802  
1998 年 11 月 20 日 (20.11.1998) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 扶桑薬品  
工業株式会社 (FUSO PHARMACEUTICAL INDUS-  
TRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府大阪市中央  
区道修町1丁目7番10号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 植村英俊 (UE-  
MURA, Hidetoshi) [JP/JP]; 〒664-0883 兵庫県伊丹市  
南鈴原3丁目133 Hyogo (JP). 奥井 文 (OKUI, Akira)[JP/JP]; 〒639-1123 奈良県大和郡山市筒井町569-1  
コーポ陸603号 Nara (JP). 小南勝也 (KOMINAMI, Kat-  
suya) [JP/JP]; 〒599-0212 大阪府阪南市自然田786-2  
Osaka (JP). 山口 希 (YAMAGUCHI, Nozomi) [JP/JP];  
〒603-8146 京都府京都市北区鞍馬口通り寺町西入  
ル新御霊口町285-79 Kyoto (JP). 三井真一 (MITSUI,  
Shinichi) [JP/JP]; 〒606-8267 京都府京都市左京区北  
白川西町86 北白川コーポラス202号 Kyoto (JP).(74) 代理人: 青山 葆, 外 (AOYAMA, Tamotsu et al.); 〒  
540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMP  
ビル 青山特許事務所 Osaka (JP).(81) 指定国 (国内): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,  
BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES,  
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,  
KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,  
MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE,  
SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VN, YU, ZA, ZW.(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ,  
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT,  
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,

[続葉有]

(54) Title: NOVEL SERINE PROTEASE BSSP6

(54) 発明の名称: 新規セリンプロテアーゼBSSP6

(57) Abstract: Proteins having the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 2, 4 and 6 and proteins derived from these  
proteins by deletion, substitution or addition of one or several amino acids in these amino acid sequences; base sequences encoding  
these proteins; a transgenic non-human animal having an altered BSSP6 expression level; an antibody against BSSP6; and a method  
for detecting BSSP6 in a specimen by using this antibody.

(57) 要約:

配列番号 2、4 および 6 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、または、こ  
れらのアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付  
加されたアミノ酸からなるタンパク質、これらをコードする塩基配列を提供する。  
さらに、BSSP6 の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物、  
BSSP6 に対する抗体、該抗体を用いる検体中の BSSP6 の検出方法を提供  
する。

WO 00/31257 A1



MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(15) 訂正情報:

PCTガゼット セクションIIの No.14/2001 (2001 年4 月 5 日)を参照

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(48) この訂正版の公開日:

2001 年4 月5 日

## 明 細 書

## 新規セリンプロテアーゼ B S S P 6

5 発明の分野

本発明は単離されたヒトおよびマウスのセリンプロテアーゼ（本明細書において各々「h B S S P 6」および「m B S S P 6」と称し、両者を区別しない場合は単に「B S S P 6」とする。）ポリヌクレオチド、それらの相同体、成熟体、前駆体、変異体および多形性変種ならびにそれらの検出方法に関する。さらには、  
10 h B S S P 6 および m B S S P 6 タンパク質ならびに h B S S P 6 および m B S S P 6 ポリヌクレオチドおよびタンパク質を含む組成物、それらの製造方法および使用に関する。

従来の技術

15 プロテアーゼは、一般に不活性前駆体として生合成され、分子内で限定加水分解を受け活性型プロテアーゼへ変換される。プロテアーゼである限りペプチド結合を加水分解する作用を有するが、種類によってその作用様式は極めて異なる。プロテアーゼはその触媒基の種類により、セリンプロテアーゼおよびシステインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、金属プロテアーゼに分類される。  
20 各種のプロテアーゼは消化性を有するものから、様々な調節ドメインを持ち基質特異性が厳密で固有のタンパク質のみを特異的に加水分解するものまで、それらの性質は多彩である。

翻訳後のタンパク質に対しても様々なプロセッシングが行われ、活性型タンパク質が作られる。多くの分泌タンパクは、まず、活性型タンパク質のN末端に通常  
25 15～60個程度のアミノ酸残基から成る分泌に関与するペプチド（分泌シグナル）を付けた不活性前駆体型（プロ体）として細胞質内のリボソーム上で合成される。このペプチド部分は細胞膜を通過する機構に関連しており、ほとんどの場合、膜を通過する際に特異的なプロテアーゼで切断・除去され、成熟型タンパク質となる。分泌シグナルは中央部に疎水性アミノ酸から成る広い疎水性領域を

持ち、N末端近くには塩基性アミノ酸残基を有している。分泌シグナルはシグナルペプチドと同義語である。また、ある種のタンパク質は不活性前駆体のN末端にさらに分泌シグナルが結合しているものも存在し、この様なタンパク質をプレプロタンパク質（プレプロ体）という。

- 5       例えば、トリプシンはアミノ酸に翻訳された直後はプレプロ体として存在し、細胞外に分泌された後はプロ体として存在し、十二指腸でエンテロペプチダーゼもしくはトリプシン自体により限定加水分解されて活性型トリプシンとなる。

10       セリンプロテアーゼの至適 pH は、中性から弱アルカリ性で、分子量は一般に 30,000 以下の場合が多い。分子量の大きい血液凝固・線溶・補体系プロテアーゼは、すべてトリプシン様セリンプロテアーゼに属しており、これらは多くの調節ドメインを持ち、生体反応において極めて重要なプロテアーゼカスケードを形成している。

15       最近、セリンプロテアーゼのコンセンサス配列に対するオリゴヌクレオチドプライマーを用いた PCR により多くの新規プロテアーゼの cDNA およびアミノ酸配列が決定されている。この方法により、Yamamura ら (Yamamura, Y. et al. ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 239, 386, 1997)、Gschwend ら (Gschwend, T. P. et al. ; Mol. Cell. Neurosci., 9, 207, 1997)、Chen ら (Chen, Z-L. et al. ; J. Neurosci., 15, 5088, 1995) およびその他の多数の研究者が新規セリンプロテアーゼを発見している。

20       特開平 9-149790 号の配列番号 3 には新規セリンプロテアーゼニューロシン (Neurosin) が開示されており、またニューロシンは Biochimica et Biophysica Acta, 1350, 11-14, 1997 にも報告されている。これによりセリンプロテアーゼ遺伝子を用いてニューロシンを大量に生産する方法および該酵素を用いる特異的阻害物質のスクリーニング方法が提供される。また、当該スクリーニング方法は、各種疾患治療剤の探索に有用であることも示されている。

25       ニューロシンのように脳・神経系で発現されるセリンプロテアーゼは脳・神経系において種々の役割を果たしていると考えられる。従って、脳・神経系において発現されている新規プロテアーゼをコードする遺伝子の単離およびこの遺伝子を使用したタンパク質の生産は、脳・神経系に関連する各種疾患の診断および治



療に有用である可能性がある。例えば、脳においてはアルツハイマー病（AD）、てんかん、脳腫瘍等の脳疾患の治療および診断に利用できる可能性がある。

ADの臨床診断は今日、DSM-III-RおよびNINCDS-ADRDAの診断基準（McKhann, G. et al. ; Neurology, 34, 939, 1994）または、DSM-III-Vの診断基準（American Psychiatric Association ; Diagnostic and statistical manuals of mental disorders, 4th ed, Washington DC, American Psychiatric Association, 1994）に基づいて一般的に行われている。しかし、これらの診断基準は、日常生活や社会生活上重大な支障を引き起こすほどの認知機能の低下を条件としているため、患者一人一人の社会生活のレベル、さらに診断に当たる医師の専門性、経験にも左右され得るものであり、科学的客観性に乏しいことが指摘されている。また、アルツハイマー病の確定診断は、病理組織学的検索によりなされるわけであるが、臨床診断と剖検診断との不一致も少なからず指摘されている。

現在、アルツハイマー病の臨床診断では補助的手段として画像診断も用いられるようになり、PETやSPECTにより海馬、大脳皮質の頭頂葉等の特異的な部位においてアルツハイマー病に特異的な代謝の低下、萎縮を初めとする脳機能の検査が可能となった。しかしながら、頭頂葉から側頭葉にかけての血流低下によりアルツハイマー病を確定するのは極めて危険である。また、MRS検査では、アルツハイマー病を含む痴呆患者に関して有用である報告は殆どない。さらに、CT・MRI画像診断も用いられているが、脳の萎縮やPVL等の白質病巣はアルツハイマー型痴呆に特異的ではなく、脳萎縮は年齢と共に進行することが報告されており、必ずしもアルツハイマー型痴呆に対して前記所見が見られるとは限らない。また、MRIは磁場強度や装置の性能または撮影条件により得られる画質が異なるため、異なる施設間で数値的比較ができるのは萎縮性変化のみである。また、血管性痴呆でも脳室拡大を認め得るし、脳底動脈領域の虚血後に海馬の萎縮を認める症例も存在する。

生物学的診断マーカーの開発は、この様な経緯の中からADの臨床診断に、より正確的な客観性を与えるものとして多くの研究者から求められてきたと同時に、1) AD治療薬の客観的な効果判定システム、2) ADの診断基準を満たす以前

の、あるいは発症前のADの検出という将来的に重要な役割が期待されている。さらに、同一の診断マーカーを用いることにより、異なる施設間の比較研究も可能となる。したがって、生物学的診断マーカーの開発は、多くのAD研究領域の中でも、最も重要な領域として認識され、将来への展望が期待されている。現在までに行われてきた診断マーカー開発へのアプローチは、ADを特徴付ける病理学的変化である老人斑や神経原線維変化の構成成分からのアプローチと、それ以外の物からのアプローチに大別される。前者として脳脊髄液タウタンパク質、A $\beta$ およびその前駆体タンパク質である $\beta$ APP、後者として抗コリン剤による瞳孔散大試験、Apo Eおよび他のAD関連遺伝子があるが良好な結果は得られていない。

セリンプロテアーゼは、癌細胞においても重要な役割を担っていると考えられる。癌を外科的にあるいは局所的放射線照射で根絶することが困難である理由は、癌に転移能力があるからである。固形腫瘍細胞が体内に広がるには、本来隣接していた細胞との接着をゆるめて、本来の組織から離れ、他の組織の中を通り血管もしくはリンパ管に到達し、基底層と管の内皮層を抜けて循環系に入り、体のどこかで循環系から出て、新しい環境中で生存し、増殖しなければならない。各種癌腫での隣接する上皮細胞との接着性は、上皮の細胞間接着分子であるカドヘリンが発現されなくなると失われるが、組織の突破は細胞外マトリックスを分解するタンパク分解酵素に依存すると考えられている。

マトリックスを分解する酵素として主に金属プロテアーゼ (Rha, S. Y. et al. ; Breast Cancer Research Treatment, 43, 175, 1997) とセリンプロテアーゼがある。これらは共同してコラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンのようなマトリックスタンパク質を分解する。特に今まで知られているセリンプロテアーゼの中でマトリックスの分解に関与するものとして、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (U-PA) がある。U-PAはタンパク分解連鎖反応に特異的な引き金の役割を持つ。その直接の標的はプラスミノゲンで、これは血中に豊富に存在し、傷や腫瘍および炎症部位などの組織の再構築部位に蓄積する不活性なセリンプロテアーゼの前駆体である。その他に、癌の転移・浸潤に関与しているプロテアーゼとして組織因子、ライソゾーム系の加水分解酵素および

コラゲナーゼ等が知られている。

現在我が国の死因の第一位を占める癌で、年間20万人以上が死亡している。ゆえに、癌の診断および治療もしくは予防の目印となる特異物質の研究が精力的に行われている。この特異物質を腫瘍マーカーもしくは腫瘍マーカー関連バイオマーカーと名付けている。これらは癌の治療前診断補助、発生臓器および病理組織型の推定、治療効果のモニタリング、再発の早期発見や予後の予測等に利用され、現在では腫瘍マーカーを用いる検査は臨床に不可欠の検査となっており、中でも肝細胞癌やヨークサック腫瘍に特異性が高いアルファ胎児タンパク（AFP）（Taketa, K. et al. ; Tumour Biol., 9, 110, 1988）および癌胎児性タンパク抗原（CEA）は世界中で広く利用されている。将来、腫瘍マーカーの必要性は益々高まり、信頼性の高い癌の血清学的診断法に有用な臓器特異的マーカー、腫瘍細胞種特異的マーカー等の開発が期待されている。現在までにヒト前立腺上皮細胞で発現しているセリンプロテアーゼであるヒト腺性カリクレイン（hK2）は前立腺癌のマーカーとして有用であることが報告されている。また、hK2は前立腺特異的抗原（PSA）の配列と78%の相同性を有しており、PSAも前立腺癌の生化学的マーカーとして広く使用されている（Mikolajczyk, S. D. et al. ; Prostate, 34, 44, 1998、Pannek, J. et al. ; Oncology, 11, 1273, 1997、Chu, T. M. et al. ; Tumour Biology, 18, 123, 1997、Hsieh, M. et al. ; Cancer Res., 57, 2651, 1997）。さらに、hK2は前立腺癌のマーカーだけでなく、胃癌のマーカーとしても有用であることが報告されている（Cho, J. Y. et al. ; Cancer, 79, 878, 1997）。その他、血清中サイトケラチン19フラグメントを測定するシフラ（CYFRA 21-1）は肺癌に有用であること（Sugiyama, Y. et al. ; Japan J. Cancer Res., 85, 1178, 1994）、ガストリン放出ペプチド前駆体（ProGRP）が肺小細胞癌に対して有用な腫瘍マーカーであること（Yamaguchi, K. et al. ; Japan, J. Cancer Res., 86, 698, 1995）が報告されている。

#### 発明の目的

ゆえに、本発明の主な目的は、脳の各部位、髄質、前立腺、精巣、粘膜腺、胎

盤、心臓および肺等の各種組織において、アルツハイマー病（AD）、てんかん、癌、炎症、不妊症、前立腺肥大症をはじめとする各種疾患の治療および診断に利用できる可能性があり、さらに、現在用いられている診断マーカーに取って代わる、優れたマーカーとなり得る新規セリンプロテアーゼを提供することである。

5

### 発明の要旨

この様な状況の下、我々はマウスおよびヒトの新規セリンプロテアーゼのクローニングに成功した。ヒト新規セリンプロテアーゼ（h B S S P 6）の成熟型はアミノ酸 2 2 9 個から成り、前立腺型はアミノ酸 2 8 2 個（配列番号 2、アミノ酸番号 5 3 ~ 2 2 9）からなり、脳型は 2 5 0 個（配列番号 2、2 1 ~ 2 2 9）からなることを証明した。また、胎盤型はさらに上流のメチオニンから開始するより大型のタンパク質であると考えられる。さらに、h B S S P 6 の変異型（以下、変異型 h B S S P 6）の成熟型はアミノ酸 2 5 4 個（配列番号 6、アミノ酸番号 1 ~ 2 5 4）からなることを証明した。マウス新規セリンプロテアーゼ（m B S S P 6）の成熟型はアミノ酸 2 2 9 個（配列番号 4、アミノ酸番号 1 ~ 2 2 9）から成り、脳型はアミノ酸 2 4 9 個（配列番号 4、アミノ酸番号 2 0 ~ 2 2 9 から成り、前立腺型はアミノ酸 2 7 6 個（配列番号 4、アミノ酸番号 4 7 ~ 2 2 9）から成ることを証明した。また、成熟型のセリンプロテアーゼのアミノ酸配列中には、セリンプロテアーゼの活性を有するコンセンサス配列が含まれている。

20

本発明を概説すれば、本発明の第 1 の態様は生物学的に活性な、成熟体セリンプロテアーゼ h B S S P 6 および m B S S P 6 アミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列である。

すなわち、配列番号 2（アミノ酸番号 1 ~ 2 2 9）に示すアミノ酸 2 2 9 個から成るアミノ酸配列（成熟型 h B S S P 6（配列番号 2））および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号 1、塩基番号 2 7 2 ~ 9 5 8）である。さらに、配列番号 6（アミノ酸番号 1 ~ 2 5 4）に示すアミノ酸 2 5 4 個から成るアミノ酸配列（変異型 h B S S P 6（配列番号 6））および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号 5、塩基番号 1 1 4 ~ 8 7 5）である。また、実質的

25

に配列番号2および6に類似するアミノ酸配列および実質的に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。あるアミノ酸配列に実質的に類似するアミノ酸配列とは、各アミノ酸配列を有するタンパク質が同等の性質を有する範囲内で該アミノ酸配列に1もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、付加および／または挿入等の修飾を施したアミノ酸配列をいう。タンパク質の修飾体には、例えば、リン酸付加体、糖鎖付加体、金属付加体（例えばカルシウム付加体）、他のタンパク質、例えばアルブミン等との融合体、またはタンパク質の二量体等が含まれる。

さらに、配列番号4（アミノ酸番号1～229）に示すアミノ酸229個から成るアミノ酸配列（成熟型mBSSP6（配列番号4））および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号3、塩基番号244～930）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

本発明の第2の態様は、成熟型hBSSP6アミノ酸配列（配列番号2）のN末端側に、配列番号2に示す-53から-1までの53個のアミノ酸が付加された、アミノ酸282個から成るアミノ酸配列（前立腺型hBSSP6（配列番号2、アミノ酸番号-53～229））および該アミノ酸をコードする塩基配列（配列番号1、塩基番号113～958）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

本発明の第3の態様は、成熟型hBSSP6アミノ酸配列（配列番号2）のN末端側に、配列番号2に示す-21から-1までの21個のアミノ酸が付加された、アミノ酸250個から成るアミノ酸配列（脳型hBSSP6（配列番号2、アミノ酸番号-21～229））および該アミノ酸をコードする塩基配列（配列番号1、塩基番号209～958）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

本発明の第4の態様は、成熟型mBSSP6アミノ酸配列（配列番号4）のN

末端側に、配列番号4に示す-20から-1までの20個のアミノ酸が付加された、アミノ酸249個から成るアミノ酸配列（脳型mBSSP6（配列番号4、アミノ酸番号-20～229））および該アミノ酸をコードする塩基配列（配列番号3、塩基番号184～930）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

本発明の第5の態様は、成熟型mBSSP6アミノ酸配列（配列番号4）のN末端側に、配列番号4に示す-47から-1までの47個のアミノ酸が付加された、アミノ酸276個から成るアミノ酸配列（前立腺型mBSSP6（配列番号4、アミノ酸番号-47～229））および該アミノ酸をコードする塩基配列（配列番号3、塩基番号103～930）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

本発明の第6の態様は、変異型hBSSP6の成熟型アミノ酸配列（配列番号6のアミノ酸1～254）のN末端に、配列番号6に示す-21～-1までの21個のアミノ酸が付加された、アミノ酸275個からなるアミノ酸配列（変異型hBSSP6（配列番号6、アミノ酸番号-21～254））および該アミノ酸をコードする塩基配列（配列番号5、塩基番号51～875）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

本発明の第7の態様は、第1～第6の態様の塩基配列を含むベクター、これにより形質転換された形質転換細胞である。

本発明の第8の態様は、第7の態様の形質転換細胞からBSSP6タンパク質を製造する方法である。

本発明の第9の態様は、BSSP6遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物である。

本発明の第10の態様は、BSSP6タンパク質またはその断片に対する抗体およびその製造方法である。

本発明の第 1 1 の態様は、第 9 の態様の抗体を用いる検体中の B S S P 6 タンパク質またはその断片を測定する方法である。

本発明の第 1 2 の態様は、B S S P 6 タンパク質を含む疾患の診断マーカーである。

5       以下、本明細書において、特記しない限り、各配列番号が示す塩基配列には、上記に示した種々のその断片、類似する塩基配列またはこれらの断片を含み、各配列番号が示すアミノ酸配列には、上記に示した種々のその断片、類似するアミノ酸配列、またはこれらの断片、もしくはこれらの修飾体を含むものとする。また、本明細書において、特記しなき限り、B S S P 6、h B S S P 6（変異型 h  
10       B S S P 6 を含む）、m B S S P 6 には、上記に示した各アミノ酸配列を有するタンパク質を含むものとする。

#### 図面の簡単な説明

15       図 1 は、human multiple tissue blot を用いたノザンブロットの結果を示す図である。

図 2 は、human multiple tissue blot II を用いたノザンブロットの結果を示す図である。

図 3 は、human brain multiple tissue blot II を用いたノザンブロットの結果を示す図である。

20       図 4 は、human brain multiple tissue blot IV を用いたノザンブロットの結果を示す図である。

図 5 は、実施例 2 において調製した mRNA を用いたノザンブロットの結果を示す図である。

25       図 6 は、実施例 2 において調製した mRNA を用いたノザンブロットの結果を示す図である。

図 7 は、実施例 4 の方法により構築したプラスミドを示す図である。

図 8 は、実施例 4 の方法によるプラスミドの構築図を示す図である。

図 9 は、h B S S P 6 の基質特異性を示す図である。

図 1 0 は、抗ヒト B S S P 6 抗体を用いた組換え体 B S S P 6 の検出を示す図

である。

図 1 1 は、h B S S P 6 の R T - P C R の結果を示す図である。

図 1 2 は、大腸菌における変異型 h B S S P 6 の発現を示す図である。

図 1 3 は、変異型特異的 R T - P C R 産物に対して h B S S P 6 プローブを用  
5 いて行った P C R - サザンハイブリダイゼーションの結果を示す図である。

### 発明の詳細な説明

本明細書中で言うプロ部分とはプロ体から活性型タンパク質を削除した部分を  
言い、プレ部分とはプレプロ体からプロ体を削除した部分を言い、プレプロ部分  
10 とはプレプロ体から活性型タンパク質を削除した部分を言う。

配列番号 2 (アミノ酸番号 1 ~ 2 2 9) に示すアミノ酸配列はアミノ酸 2 2 9  
個から成る h B S S P 6 成熟型あるいは活性型タンパク質であり、それをコード  
する塩基配列は塩基数 6 8 7 個から成る。本発明者らは本発明の成熟型タンパク  
質のアミノ酸配列中の N 末端のアミノ酸 1 ~ 数個程度を欠失または付加させても  
15 セリンプロテアーゼ活性が保持されることを証明しているが、好ましくは本アミ  
ノ酸配列である。

配列番号 2 (アミノ酸番号 - 7 0 ~ 2 2 9) に示すアミノ酸配列はアミノ酸 2  
9 9 個から成る h B S S P 6 前立腺型タンパク質であり、それをコードする塩基  
配列は塩基数 8 9 7 個から成る。本発明者らは前立腺型タンパク質のアミノ酸配  
20 列中の N 末端のアミノ酸 1 ~ 数個程度を欠失させてもセリンプロテアーゼ活性が  
保持されることを証明しているが、好ましくは本アミノ酸配列である。アミノ酸  
番号 - 7 0 ~ - 1 はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、h B S S P 6 タンパ  
ク質の前駆体型と考えられる。

配列番号 2 (アミノ酸番号 - 2 1 ~ 2 2 9) に示すアミノ酸配列はアミノ酸 2  
5 0 個から成る h B S S P 6 脳型タンパク質であり、それをコードする塩基配列  
は塩基数 7 5 0 個から成る。本発明者らは脳型タンパク質のアミノ酸配列中の N  
末端のアミノ酸約 1 ~ 数個程度を欠失または付加させてもセリンプロテアーゼ活  
性が保持されることを証明しているが、好ましくは本アミノ酸配列である。アミ  
ノ酸番号 - 2 1 ~ - 1 はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、h B S S P 6 タ



ンパク質の前駆体型と考えられる。

配列番号 4（アミノ酸番号 1～229）に示すアミノ酸配列はアミノ酸 229 個から成る mBSSP6 成熟型あるいは活性型タンパク質であり、それをコードする塩基配列は、塩基数 687 個から成る。本発明者らは成熟型タンパク質のアミノ酸配列中の N 末端のアミノ酸 1～数個程度を欠失させてもセリンプロテアーゼ活性が保持されることを証明しているが、好ましくは本アミノ酸配列である。

配列番号 4（アミノ酸番号－20～229）に示すアミノ酸配列はアミノ酸 249 個から成る mBSSP6 脳型タンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数 747 個から成る。本発明者らは脳型タンパク質のアミノ酸配列中の N 末端のアミノ酸約 1～数個程度を欠失または付加させてもセリンプロテアーゼ活性が保持されることを証明しているが、好ましくは本アミノ酸配列である。アミノ酸番号－20～－1 はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、mBSSP6 タンパク質の前駆体型と考えられる。

配列番号 4（アミノ酸番号－47～229）に示すアミノ酸配列はアミノ酸 276 個から成る mBSSP6 前立腺型タンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数 828 個から成る。本発明者らは前立腺型タンパク質のアミノ酸配列中の N 末端のアミノ酸約 1～数個程度を欠失させてもセリンプロテアーゼ活性が保持されることを証明しているが、好ましくは本アミノ酸配列である。アミノ酸番号－47～－1 はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、mBSSP6 タンパク質の前駆体型と考えられる。

配列番号 6（アミノ酸番号 1～254）に示すアミノ酸配列は、アミノ酸 254 個から成る変異型 hBSSP6 の成熟型あるいは活性型タンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数 762 個から成る。変異型 hBSSP6 と hBSSP6 とのアミノ酸配列上での差異は、hBSSP6 アミノ酸配列（配列番号 2）は変異型 hBSSP6 アミノ酸配列（配列番号 6）のアミノ酸番号 46～70 が除去された配列である。尚、変異型 hBSSP6 に言う変異型とは hBSSP6 と単に区別するために使用するものである。

配列番号 6（アミノ酸番号－21～254）に示すアミノ酸配列は、アミノ酸 275 個から成る変異型 hBSSP6 の前駆体タンパク質であり、それをコード

する塩基配列は塩基数825個から成る。アミノ酸番号-21~-1はプレプロ部分あるいはプロ部分である。

本発明のhBSSSP6（変異型hBSSSP6を含む、以下同じ）もしくはmBSSSP6をコードする塩基配列は、該タンパク質を発現している細胞からmRNAを調製して、常法により二本鎖DNAに変換して得ることができる。mRNAの調製にはグアニジンイソチオシアネート・塩化カルシウム法（Chirwin, et al., Biochemistry, 18, 5294, 1979）等を用いることができる。全RNAからのポリ（A）+RNAの調製はオリゴ（dT）を結合した担体、例えばセファロースあるいはラテックス粒子等を用いたアフィニティークロマトグラフィー等を用いて行うことができる。上記のごとくして得られたRNAを鋳型にして、3'末端に存在するポリ（A）鎖に相補的なオリゴ（dT）またはランダムプライマーあるいはhBSSSP6もしくはmBSSSP6のアミノ酸配列の一部に相応する合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして逆転写酵素で処理し、この様にして得られたmRNAに相補的なDNAもしくはcDNAから成るハイブリッドのmRNA鎖を、例えばイー・コリ（E. coli）RNase H、イー・コリDNAポリメラーゼ1、イー・コリDNAリガーゼで処理し、DNA鎖に変換することにより、二本鎖cDNAを得ることができる。

hBSSSP6もしくはmBSSSP6遺伝子塩基配列をもとに合成したプライマーを用いて、hBSSSP6もしくはmBSSSP6発現細胞ポリ（A）+RNAを鋳型にしてRT-PCR法によりクローニングすることも可能である。また、PCRによらず、hBSSSP6もしくはmBSSSP6遺伝子塩基配列をもとにプローブを作製・合成し、直接cDNAライブラリーをスクリーニングし、目的とするcDNAを得ることもできる。本発明の遺伝子を、これらの方法により得られた遺伝子の中から、その遺伝子の塩基配列を確認することにより選択することができる。本発明の遺伝子は、例えばホスホイミダイト法（Mattenczi, M. D. et al., J. Am. Chem. Soc., 130, 3185, 1981）等の核酸化学合成を用いる常法に従って製造することもできる。

上記のようにして得られたhBSSSP6またはmBSSSP6遺伝子を用いて、各種組織におけるこれらの発現を調べることができる。

ノザン・ブロット解析の場合、h B S S P 6は脳の各部位、髄質、胎盤、肺、心臓、前立腺、精巣、粘膜腺等で発現が認められ、m B S S P 6は15日目の胎児脳、および生後3ヶ月のマウスの精巣および前立腺において発現が認められた。RT-PCR解析の場合においては、h B S S P 6は成体の海馬および前立腺で発現が認められ、m B S S P 6は新生児から生後12日までのマウスの脳、および生後4ヶ月のマウスの前立腺で発現が認められた。また、変異型h B S S P 6のmRNAは前立腺癌細胞株であるPC3、DU145、LNCaPに発現し、組織においては、精巣、肺、胎児脳、成人海馬で発現していた。ゆえに、脳、前立腺、髄質、肺、胎盤、心臓、精巣および粘膜腺において、本発明の新規セリンプロテアーゼが様々な役割を担っていると予想される。例えば、脳においてはアルツハイマー病(AD)、てんかん、脳腫瘍等の脳疾患の治療および診断に利用できる可能性があり、また、その他の組織においては癌、特に前立腺癌、炎症、不妊症、前立腺肥大症をはじめとする各種疾患の治療および診断に利用できる可能性がある。その他に血液凝固・線溶・補体系にも何らかの影響を及ぼしていると予想できる。

なお、一般に真核生物の遺伝子は多形現象を示すことが多く、この現象によって1個あるいはそれ以上のアミノ酸が置換される場合もあり、また、その場合であってもタンパク質の活性が保持される場合もある。ゆえに、配列番号2、4または6のいずれかに示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子を人工的に改変したものをを用いて得られたタンパク質をコードする遺伝子は、該タンパク質が本発明の遺伝子の特徴的な機能を有する限り全て本発明に含まれる。さらに、配列番号2、4または6のいずれかに示されるアミノ酸配列を人工的に改変したタンパク質は、本発明のタンパク質の特徴を有する限り全て本発明に含有される。改変とは、置換、欠失、付加および/または挿入を含むと解する。特に、配列番号2もしくは4に示すh B S S P 6もしくはm B S S P 6成熟型タンパク質のN末端アミノ酸に数個のアミノ酸を付加あるいは欠失等の改変をさせても、活性が保持されることを本発明者らは証明している。

すなわち、本発明のタンパク質には配列番号2、4または6のいずれかに記載のアミノ酸配列、またはこれらのアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ

酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたアミノ酸配列を含み、セリンプロテアーゼファミリーに属するタンパク質が含まれる。

所望のアミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる

5 (Grantham, R. et al., Nucleic Acids Res., 9, r43, 1981)。従って、コドンの縮重を考慮して塩基配列を適宜改変したものもまた本発明の塩基配列に含まれる。さらに、これら塩基配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドから成るプライマーを利用した部位特異的変異導入法 (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81, 5662, 10 1984) 等に従って行うことができる。

さらに、配列番号 1、3 または 5 のいずれかに記載の塩基配列またはそれに相補的な塩基配列とハイブリダイズすることができ、かつその塩基配列によってコードされるタンパク質が本発明による h B S S P 6 もしくは m B S S P 6 と同等の性質を有する限り、その DNA は本発明による DNA に含有される。ストリン  
15 ジェントな条件下で特定配列にハイブリダイズすることができる配列は、特定配列がコードするタンパク質と類似した活性を持つものが多いと考えられる。本発明におけるストリンジェントな条件とは、例えば、5 × S S C、5 % デンハート溶液 (0. 1 % B S A、0. 1 % F i c o l l 4 0 0、0. 1 % P V P)、0. 5 % S D S および 2 0 μ g / m l 変性サケ精子 DNA を含有する溶液中で、3  
20 7 ° C にて一夜インキュベートし、ついで室温にて 0. 1 % S D S 含有 2 × S S C で洗浄する条件である。S S C の代わりに適宜 S S P E を使用してもよい。

配列番号 1、3 または 5 のいずれかに記載の塩基配列に基づいて、h B S S P 6 もしくは m B S S P 6 遺伝子を検出するためのプローブを設定することができる。あるいは、これらの塩基配列を含む DNA や RNA を増幅するためのプライ  
25 マーを設定することができる。与えられた配列をもとにプローブやプライマーを設定することは当業者が日常的に行っている。設定された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを化学合成によって得ることができる。そしてそのオリゴヌクレオチドに適当な標識を付加すれば、様々な形式のハイブリダイゼーションアッセイに利用することができる。あるいは P C R の様な核酸の合成反応に利用するこ

とができる。プライマーに利用するオリゴヌクレオチドは少なくとも10塩基、好適には15～50塩基の長さとするのが望ましく、プローブに利用するオリゴヌクレオチドは100塩基から全長の長さであることが望ましい。

さらに、本発明が提供するhBSSP6もしくはmBSSP6のcDNA塩基配列に基づいて、ゲノム中に存在するhBSSP6もしくはmBSSP6遺伝子のプロモーター領域、エンハンサー領域を取得することも可能である。具体的には特開平6-181767号、J. Immunol., 155, 2477, 1995、Proc. Natl. Acad. Sci, USA., 92, 3561, 1995) 等と同様の方法でこれらの制御領域の取得が可能である。本明細書中で言うプロモーター領域とは転写開始部位の上流に存在する遺伝子の発現を制御するDNA領域を、エンハンサー領域とはイントロン、5'非翻訳領域、または3'非翻訳領域に存在する遺伝子の発現を増強するDNA領域を言う。

本発明はまた、配列番号1に示す塩基配列もしくは配列番号2のアミノ酸配列をコードする塩基配列、配列番号3に示す塩基配列もしくは配列番号4のアミノ酸配列をコードする塩基配列、配列番号5に示す塩基配列もしくは配列番号6のアミノ酸配列をコードする塩基配列、あるいは、これらに類似する塩基配列を含むことを特徴とするベクターにも関する。ここで特定の塩基配列に類似する塩基配列とは、上記したストリンジェントな条件下で特定の塩基配列またはこれに相補的な塩基配列とハイブリダイズすることができ、かつその塩基配列によってコードされるタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列である。

ベクターは例えば、Invitrogen社製のpBAD/His、pRSETA、pcDNA2.1、pTrcHis2A、pYES2、pBlueBac4.5、pcDNA3.1、pSecTag2、Novagen社製のpET、pBAC、Promega社製のpGEM、Stratagene社製のpBluescriptIIもしくはPharmacia社製のpGEX、pUC18/19、pFastBAC1 (GIBCO社製) 等、本発明のタンパク質を発現し得るベクターであれば特に限定されないが、好ましくは、実施例記載のpCRII-TOPOベクター、および、商業的に入手し得る発現ベクター、例えばp

S e c T a g 2 Aベクター、p S e c T a g 2 Bベクター（I n v i t r o g e n社）を用い、自体公知の方法で本発明のタンパク質の分泌に適した分泌シグナル核酸配列と、その3'下流側に、T a g核酸配列、切断可能核酸配列および本発明の成熟体または活性型タンパク質をコードする核酸配列を挿入することができるクローニング部位をこの順序に組み込んで構築したタンパク質発現ベクター（本願出願人による「タンパク質発現ベクターとその使用」についての同日付の特許出願明細書）を用いる。具体的には、分泌シグナルとして、トリプシンシグナル、T a g塩基配列としてポリヒスチジンをコードする塩基配列、切断可能塩基配列として、酵素特異的切断が可能なアミノ酸配列をコードする塩基配列である、アミノ酸配列Asp-Asp-Asp-Asp-Lysをコードする塩基配列（当該アミノ酸配列はエンテロカイネースにより認識され、そのC末端部分において、組換え融合タンパク質が切断される。）を用いることが好ましい。

さらに、本発明は上記したようなベクターによりこれらが保持する本発明の塩基配列を発現可能に保持する形質転換細胞を提供する。本明細書における形質転換細胞に用いる宿主細胞としては、好ましくは動物細胞および昆虫細胞であるが、本発明の発現ベクター中の目的タンパク質をコードする核酸配列を発現し、細胞外に分泌することが可能な全ての細胞（微生物を含む）が挙げられる。

本明細書における動物細胞もしくは昆虫細胞としては、それぞれヒト由来の細胞、ハエもしくはカイコ由来の細胞が挙げられる。例えば、C H O細胞、C O S細胞、B H K細胞、V e r o細胞、ミエローマ細胞、H E K 2 9 3細胞、H e L a細胞、J u r k a t細胞、マウスL細胞、マウスC 1 2 7細胞、マウスF M 3 A細胞、マウス繊維芽細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、S 2、S f 9、S f 2 1、H i g h F i v e<sup>TM</sup>（登録商標）細胞等がある。本明細書における微生物とは、大腸菌もしくは酵母等が含まれる。

本発明のタンパク質は、それ自体、単離・精製・認識しやすいように組換え融合タンパク質として発現させることができる。組換え融合タンパク質とは目的タンパク質をコードする核酸配列により発現されたタンパク質のN末端側または／およびC末端側に適当なペプチド鎖を付加して発現させたタンパク質である。本明細書における組換えタンパク質とは、目的タンパク質をコードする核酸配列を

本発明の発現ベクターに組み込み、発現された組換え融合タンパク質から目的タンパク質をコードする核酸由来でないアミノ酸配列を切断したものであり、実質的に本発明のタンパク質と同義語である。

上記発現ベクターの宿主細胞への導入法としては、例えば、リポポリアミン法、DEAE-デキストラン法、ハナハン法、リポフェクチン法、リン酸カルシウム法によるトランスフェクション、マイクロインジェクションおよびエレクトロポレーション等の方法がある。

本発明は、上記したような本発明の塩基配列で形質転換した細胞を培養し、産生されたhBSSSP6またはmBSSSP6を採取する、hBSSSP6またはmBSSSP6の製造法にも関する。細胞の培養、タンパク質の分離、精製も、自体公知の方法によって行うことができる。

本発明は、また、本発明の新規なセリンプロテアーゼの阻害剤にも関する。阻害剤のスクリーニングは、候補化合物と接触させた酵素の活性を、候補化合物と接触させていない酵素の活性と比較する等の自体公知の方法により行うことができる。

本発明は、hBSSSP6もしくはmBSSSP6遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物に関する。ここで、hBSSSP6もしくはmBSSSP6遺伝子とは、hBSSSP6もしくはmBSSSP6をコードするcDNA、ゲノムDNAあるいは合成DNAを含む。また、遺伝子の発現には転写と翻訳のいずれのステップも含まれる。本発明によるトランスジェニック非ヒト動物は、hBSSSP6もしくはmBSSSP6の機能あるいは発現調節の研究、hBSSSP6もしくはmBSSSP6が関与すると予想される疾患のメカニズム解明、医薬品のスクリーニング・安全性試験に用いる疾患モデル動物の開発に有用である。

本発明においては、遺伝子の発現を正常に調節しているいくつかの重要な部位（エンハンサー、プロモーター、イントロン等）の一部に欠失、置換、付加および／または挿入などの変異を起こさせることにより、本来の遺伝子の発現レベルと比較して上昇または下降するように人工的に修飾することができる。この変異の導入は、公知の方法により行うことができ、トランスジェニック動物を得ることができる。

トランスジェニック動物とは狭義には遺伝子組換えにより、外来遺伝子が生殖細胞に人為的に導入された動物のことをいい、広義にはアンチセンスRNAを用いて特定の遺伝子の機能を抑えたアンチセンス・トランスジェニック動物や、胚性幹細胞（ES細胞）を用いて特定の遺伝子をノックアウトした動物、点突然変異DNAを導入した動物を含み、個体発生の初期に外来遺伝子が安定して染色体に導入され、その子孫に遺伝形質として伝達され得る動物のことをいう。

本明細書中でいうトランスジェニック動物とはヒト以外のすべての脊椎動物を含む広義の意味に解する。本発明におけるトランスジェニック動物は、hBSSP6もしくはmBSSP6の機能あるいは発現調節の研究、ヒトにおいて発現している細胞に関連する疾患のメカニズムの解明、医薬品のスクリーニング・安全性試験に用いる疾患モデル動物の開発に有用である。

トランスジェニック動物の作製方法は、位相差顕微鏡下で前核期卵子の核に、微小ピペットで遺伝子を直接導入する方法（マイクロインジェクション法、米国特許第4873191号）、胚性幹細胞（ES細胞）を使用する方法などがある。その他、レトロウィルスベクターまたはアデノウィルスベクターに遺伝子を挿入し、卵子に感染させる方法、また、精子を介して遺伝子を卵子に導入する精子ベクター法等が開発されている。

精子ベクター法とは、精子に外来遺伝子を付着またはエレクトロポレーション等の方法で精子細胞内に取り込ませた後に、卵子に受精させることにより、外来遺伝子を導入する遺伝子組換え法である（M. Lavitrano et al., Cell, 57, 717, 1989）。あるいはバクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼ系やサッカロマイセス・セレビシアエ（*Saccharomyces cerevisiae*）のFLPリコンビナーゼ系等によるin vivoにおける部位特異的遺伝子組換えを用いることもできる。また、レトロウィルスを使用して、非ヒト動物へ目的タンパク質のトランスジーンを導入する方法も報告されている。

マイクロインジェクション法によるトランスジェニック動物作製方法は、例えば、以下に示すようにして行われる。

まず、発現制御に関わるプロモーター、特定のタンパク質をコードする遺伝



子、ポリ A シグナルから基本的に構成されるトランスジーンが必要である。プロモーター活性により特定分子の発現様式や発現量が左右され、また、導入トランスジーンのコピー数や染色体上の導入部位により作製されたトランスジェニック動物が系統間で異なるため、各系統間で発現様式・発現量を確認する。

5 非翻訳領域やスプライシングにより発現量が増加することが判明しているため、予めポリ A シグナルの前にスプライシングされるイントロン配列を導入してもよい。受精卵に導入する遺伝子はできるだけ純度の高いものを使用することが重要である。使用する動物としては、受精卵採取用マウス（5～6週齢）、交配用雄マウス、偽妊娠雌マウス、輸精管結紮雄マウス等が用いられる。

10 効率よく受精卵を得るために、ゴナドトロピン等により排卵を誘発してもよい。受精卵を回収し、マイクロインジェクション法にて卵子の雄性前核にインジェクションピペット中の遺伝子を注入する。注入した卵子を輸卵管に戻すための動物（偽妊娠雌マウス等）を用意し、一匹に対して約 10～15 個を移植する。その後、誕生したマウスにトランスジーンが導入されているか否かを、  
15 尾の先端部からゲノム DNA を抽出し、サザン法あるいは PCR 法によりトランスジーンを検出するか、あるいは相同組み換えが起こったときのみに活性化  
するマーカー遺伝子を挿入したポジティブクローニング法により確認することが  
できる。さらに、トランスジーンが発現を確認するため、ノザン法もしくは  
20 RT-PCR 法によりトランスジーン由来転写産物を検出する。または、タン  
パク質に対する特異的抗体によって、ウェスタンブロッティングを行ってもよい。

本発明のノックアウトマウスは、mBSSP6 遺伝子の機能が失われるように  
に処理されたものである。ノックアウトマウスとは相同組換え技術により任意  
の遺伝子を破壊し、機能を欠損させたトランスジェニックマウスをいう。ES  
25 細胞を用いて相同組換えを行い、一方の対立遺伝子を改変・破壊した胚性幹細胞  
を選別し、ノックアウトマウスを作製することができる。例えば、受精卵の  
胚盤胞や桑実胚期に遺伝子を操作した胚性幹細胞を注入して、胚性幹細胞由来  
の細胞と胚由来の細胞が混ざったキメラマウスを得る。このキメラマウス（キ  
メラとは、2 個以上の受精卵に基づいた体細胞で形成される単一個体をいう）

と正常マウスを交配すると、一方の対立遺伝子の全てが改変・破壊されたヘテロ接合体マウスを作製することができる。さらに、ヘテロ接合体マウス同士を交配することで、ホモ接合体マウスが作製できる。

5 相同組換えとは、遺伝子組換え機構で塩基配列が同じ、または非常に類似している2つの遺伝子間で起こる組換えのことをいう。相同組換えを起こした細胞の選別にはPCRを使用することができる。挿入遺伝子の一部と挿入が期待される領域の一部をプライマーとして用いるPCR反応を行い、増幅産物ができた細胞で相同組換えを起こしていることが判明できる。また、胚幹細胞で発現している遺伝子に相同組み換えを起こさせる場合には、導入遺伝子にネオマイシン耐性遺伝子を結合させておき、導入後に細胞をネオマイシン耐性にさせることにより選択することができる等、公知の方法およびそれらの変法を用いて容易に選択することができる。

10 本発明はまた、hBSSSP6もしくはmBSSSP6を認識する抗体を提供する。本発明の抗体には例えば、配列番号2、4または6のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するタンパク質またはその断片に対する抗体が含まれる。hBSSSP6  
15 もしくはmBSSSP6または本発明のhBSSSP6もしくはmBSSSP6の断片に対する抗体（例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ペプチド抗体）または抗血清は、本発明のhBSSSP6もしくはmBSSSP6またはその断片等を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造  
20 することができる。

本発明のhBSSSP6もしくはmBSSSP6またはその断片は、投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体または希釈剤、担体と共に温血動物に対して投与される。投与に際して抗体産生を高めるために、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与しても良い。投与は通常1～6週毎に1回  
25 づつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ等が挙げられるが、マウスおよびラットが好ましくは用いられる。ラットにはWistarおよびSD系ラット等が好ましく、マウスにはBALB/c、C57BL/6およびICR系マウス等が好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められる個体を選択し、最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識化hBSSP6またはmBSSP6と抗血清とを反応させた後、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、例えばケーラーとミルスタインの方法 (Nature, 256, 495, 1975) やその変法 (J. Immunol. Method, 39, 285, 1980、Eur. J. Biochem., 118, 437, 1981、Nature, 285, 446, 1980) に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウイルス等が挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。さらに融合効率を高めるために、適宜レクチン、ポリ-L-リジンもしくはDMSOを添加することもできる。

骨髓腫細胞としては例えばX-63Ag8、NS-1、P3U1、SP2/O、AP-1等が挙げられるが、好ましくはSP2/Oが用いられる。用いられる抗体産生細胞 (脾臓細胞) 数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:20～20:1であり、PEG (好ましくはPEG1000～PEG6000) を10～80%程度の濃度で添加し、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。抗BSSP6抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、hBSSP6もしくはmBSSP6抗原を直接または担体と共に吸着させた固相 (例えば、マイクロプレート) にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体 (細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる) またはプロテインAを加え、固相に結合した抗hBSSP6もしくはmBSSP6抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素等で標識したBSSP6を加え、固相に結合した抗BSSP6モノクローナル抗体を検出する方法等が挙げられる。

抗hBSSP6もしくはmBSSP6モノクローナル抗体の選別およびクロー

ニングは、自体公知またはそれに準じる方法に従って行うことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行われる。選別、クローニングおよび育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地、またはハイブリドーマ培養用無血清培地等を用いることができる。培養温度は、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行われる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗hBSSP6もしくはmBSSP6抗体価の測定と同様にして測定できる。すなわち、測定方法としてはラジオイムノアッセイ（RIA）法、酵素免疫測定法（ELISA）法、FIA（蛍光イムノアッセイ）法、ブランク測定法、凝集反応法等を用いることができるが、以下に示すようなELISA法が好ましい。

#### ELISA法によるスクリーニング

免疫抗原と同様の操作で調製したタンパク質をELISAプレートの各ウェルの表面に固定化する。次に、非特異的吸着を防止する目的で、BSA、MSA、OVA、KLH、ゼラチンもしくはスキムミルク等を各ウェルに固定化する。この各ウェルにハイブリドーマ培養上清液を添加し、一定時間放置し免疫反応を行わせる。PBS等を洗浄液として各ウェルを洗浄する。この洗浄液中には界面活性剤を添加することが好ましい。酵素標識二次抗体を添加し一定時間放置する。標識酵素としては、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ等を用いることができる。同じ洗浄液で各ウェルを洗浄後、使用した標識酵素の基質溶液を添加し酵素反応を行わせる。添加したハイブリドーマ培養上清液中に目的とする抗体が存在する場合は酵素反応が進行し基質溶液の色が変化する。

クローニングは、通常半固体アガー法や限界希釈法等のそれ自体公知の方法で行うことができ、具体的には前記の方法で目的とする抗体を産生するウェルを確認した後、クローニングを行いシングルクローンを得る。クローニング法としては、培養プレート1ウェルあたりに1個のコロニーが形成するようにハイブリド

ーマ細胞を希釈して培養する限界希釈法等を用いると良い。限界希釈法によるクローニングには、コロニー形成能と高めるために支持細胞を用いるか、インターロイキン6などの細胞増殖因子を添加しても良い。その他、FACSおよびシングルセルマニプレーション法を用いてクローニングすることができる。クローン化されたハイブリドーマを、好ましくは無血清培地中で培養し、至適量の抗体をその上清に加える。この様にして得られた単一のハイブリドーマは、フラスコや細胞培養装置を用いて大量培養を行うか、動物の腹腔内で培養する (J. Immunol. Meth., 53, 313, 1982) ことにより、モノクローナル抗体を得ることができる。フラスコ内で培養を行う場合は、0～20%のFCSを含む細胞培養用培地 (IMDM、DMEM、RPMI 1640およびMEM等) を用いて行うことができる。動物の腹腔内で培養する場合は、細胞融合に使用した骨髓腫細胞の由来となった動物と同種、同系統の動物または胸腺欠損ヌードマウス等を使用することが好ましく、予めプリスタン等の鉱物油を投与してからハイブリドーマを移植する。1～2週間後腹腔内に骨髓腫細胞が増殖し、モノクローナル抗体を含む腹水を得ることができる。

本発明によるモノクローナル抗体は、hBSSP6もしくはmBSSP6に特異的なエピトープを認識するものを選択することによって、他のタンパク質と交差しないものとすることができる。一般的にそのタンパク質を構成するアミノ酸配列の中から、連続する少なくとも3以上のアミノ酸残基、望ましくは7～20アミノ酸のアミノ酸配列によって提示されるエピトープは、そのタンパク質に固有のエピトープを示すと言われている。従って、配列番号2、4または6のいずれかに記載されたアミノ酸から選択され、かつ連続する少なくとも3アミノ酸残基から成るアミノ酸配列を持つペプチドによって構成されるエピトープを認識するモノクローナル抗体は、本発明におけるhBSSP6もしくはmBSSP6特異的なモノクローナル抗体といえる。配列番号2、4および6に記載されたアミノ酸配列の間で保存されたアミノ酸配列を選べば、BSSP6ファミリーに共通のエピトープを選択することができる。あるいは各配列に特異的なアミノ酸配列を含む領域であれば、それぞれのタンパク質の識別が可能なモノクローナル抗体を選択することができる。

抗hBSSP6またはmBSSP6モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。公知の精製法としては、例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、硫酸沈殿法、イオン交換体（例えばDEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲル濾過法、抗原結合固相またはプロテインAもしくはプロテインG等の活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法のような手法を施すことができる。精製過程において凝集物の形成や抗体価の低下を防止する目的で、例えばヒト血清アルブミンを0.05～2%の濃度で添加する。その他、グリシン、 $\alpha$ -アラニン等のアミノ酸類、特にリジン、アルギニンおよびヒスチジン等の塩基性アミノ酸、グルコースやマンニトール等の糖類または塩化ナトリウム等の塩類を添加しても良い。IgM抗体の場合、特に凝集しやすいことが知られているため、 $\beta$ -プロピオニラクトンおよび無水酢酸で処理しても良い。

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアタンパク質との複合体を作り、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行い、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造することができる。温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアタンパク質との複合体に関し、キャリアタンパク質の種類およびキャリアとハプテンとの混合比は、キャリアに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率よくできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させても良いが、例えばウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカップリングさせる方法が用いられる。また、ハプテンとキャリアのカップリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬などが用いられる。縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤と共に投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全

フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与しても良い。投与は、通常2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行われる。ポリクローナル抗体は上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水等、好ましくは血液から採取することができる。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。

h B S S P 6 もしくは m B S S P 6 またはその断片に対するモノクローナル抗体ならびにポリクローナル抗体は、h B S S P 6 もしくは m B S S P 6 を発現している細胞に関連する疾病の診断や治療に利用することが可能である。これらの抗体を用いて、本発明の h B S S P 6 もしくは m B S S P 6 またはその断片との免疫学的な結合に基づき、h B S S P 6 もしくは m B S S P 6 またはその断片を測定することができる。具体的には、これらの抗体を用いて h B S S P 6 もしくは m B S S P 6 もしくはその断片を測定する方法としては、例えば、不溶性担体に結合させた抗体と標識化抗体とにより h B S S P 6 もしくは m B S S P 6 またはその断片を反応させて生成したサンドイッチ錯体を検出するサンドイッチ法、また、標識化 h B S S P 6 もしくは m B S S P 6 と検体中の h B S S P 6 もしくは m B S S P 6 またはその断片を抗体と競合的に反応させ、抗体と反応した標識抗原量から検体中の h B S S P 6 もしくは m B S S P 6 またはその断片を測定する競合法を利用して検体中の h B S S P 6 もしくは m B S S P 6 またはその断片を測定する方法が挙げられる。

サンドイッチ法による h B S S P 6 もしくは m B S S P 6 またはその断片の測定においては、まず、固定化抗体と h B S S P 6 もしくは m B S S P 6 またはその断片とを反応させた後、未反応物を洗浄によって完全に除去し、標識化抗体を添加して固定化抗体－h B S S P 6 もしくは m B S S P 6 標識化抗体を形成させる2ステップ法もしくは固定化抗体、標識化抗体および h B S S P 6 もしくは m B S S P 6 またはその断片を同時に混合する1ステップ法などを用いることができる。

測定に使用される不溶性担体は、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリブ

ロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアクリル酸エステル、ナイロン、ポリアセタール、フッ素樹脂等の合成樹脂、セルロース、アガロース等の多糖類、ガラス、金属等が挙げられる。不溶性担体の形状としては、例えばトレイ状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、試験管等の種々の形状を用いることができる。抗体を吸着した担体は、適宜アジ化ナトリウム等の防腐剤の存在下、冷所に保存する。

抗体の固層化には、公知の化学的結合法または物理的吸着法を用いることができる。化学的結合法としては例えばグルタルアルデヒドを用いる方法、N-スクシニイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサノ-1-カルボキシレートおよびN-スクシニイミジル-2-マレイミドアセテートなどを用いるマレイミド法、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸などを用いるカルボジイミド法が挙げられる。その他、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニミドエステル法、N-サクシミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸法、ビスジアゾ化ベンジジン法、ジパルミチルリジン法が挙げられる。あるいは、先に被検出物質とエピトープの異なる2種類の抗体を反応させて形成させた複合体を、抗体に対する第3の抗体を上記の方法で固層化させておいて捕捉することも可能である。

標識物質としては、酵素、蛍光物質、発光物質、放射性物質および金属キレート等を使用するのが好ましい。酵素としては、例えばペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルター5-ステロイドイソメラーゼ、 $\alpha$ -グリセロールホスフェートデヒドロゲナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、西洋わさびパーオキシダーゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ等が挙げられ、蛍光物質としては、例えばフルオレセインイソチアネート、フィコビリプロテイン、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、オルトフタルアルデヒド等が挙げられ、発光物質としてはイソルミノール、ルシゲニン、ルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩



およびその修飾エステル、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、エクオリン等が挙げられ、放射性物質としては $^{125}\text{I}$ 、 $^{127}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 等が挙げられるが、これらに限らず免疫学的測定法に使用することができるものであれば特に限定されない。さらに、抗体にビオチン、ジニトロフェニル、ピリドキサルまたはフルオレサミンの様な低分子ハプテンを結合させても良い。好ましくは西洋わさびペルオキシダーゼを標識化酵素として用いる。本酵素は多くの基質と反応することができ、過ヨウ素酸法によって容易に抗体に結合させることができる。

標識化剤が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤を用いる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質溶液として $\text{H}_2\text{O}_2$ を用い、発色剤として2, 2'-アジノージー [3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸] アンモニウム塩 (ABTS)、5-アミノサリチル酸、オルトフェニレンジアミン、4-アミノアンチピリン、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン等を使用することができ、酵素にアルカリフォスファターゼを用いる場合は基質としてオルトニトロフェニルフォスフェート、パラニトロフェニルリン酸等を使用することができ、酵素に $\beta$ -D-ガラクトシダーゼを用いる場合は基質としてフルオレセインージー ( $\beta$ -D-ガラクトピラノシド)、4-メチルウンベリフェニルー  $\beta$ -D-ガラクトピラノシド等を使用することができる。本発明には、また、前述のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体および試薬類をキット化したのものも含まれる。

架橋剤としては、N, N'-オルトフェニレンジマレイミド、4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、6-マレイミドヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、4, 4'-ジチオピリジン、その他公知の架橋剤が利用可能である。これらの架橋剤と酵素および抗体との反応は、それぞれの架橋剤の性質に応じて既知の方法に従って行えばよい。また、抗体としては、場合によっては、そのフラグメント、例えばF a b'、F a b、F (a b')<sub>2</sub>を用いる。また、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体にかかわらず同様の処理により酵素標識体を得ることができる。上記架橋剤を用いて得られる酵素標識体をアフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法にて精製すれ

ば、更に感度の高い免疫測定系が可能となる。精製した酵素標識化抗体は、安定剤としてチメロサルもしくはグリセリン等を加えて、あるいは凍結乾燥して冷暗所に保存する。

測定対象は、血漿、血清、血液、尿、組織液、脳脊髄液等の体液等、h B S S P 6 もしくはm B S S P 6 またはその断片を含む試料あるいはこれらの前駆体またはその断片を含む試料であれば限定されない。

以下、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### 実施例 1 新規セリンプロテアーゼのクローニング

human brain cDNA library (Clontech社) を鋳型にして、プライマー配列 1 ; GTG CTC ACN GCN GCB CAY TG (配列番号 3 6) 、 2; CCV CTR WSD CCN CCN GGC GA (配列番号 3 7) に示すセリンプロテアーゼに共通のアミノ酸に対応する塩基配列のプライマーを用いた P C R 法でクローニングを行った。すなわち鋳型を 5  $\mu$  l 、 1 0  $\times$  E x T a q バッファーを 5  $\mu$  l 、 d N T P を 5  $\mu$  l 、 上記プライマーを各 1 0 p m o l 、 E x T a q (TAKARA社製) を 0 . 5  $\mu$  l 加え滅菌水で全量を 5 0  $\mu$  l とし、9 4  $^{\circ}$ C、0 . 5 分、5 5  $^{\circ}$ C、0 . 5 分、7 2  $^{\circ}$ C、1 分のサイクルで 3 5 回 P C R を行った。この P C R 産物を T O P O T A クローニングキット (Invitrogen社) 添付の p C R I I - T O P O ベクターと混ぜ、室温で 5 分間放置した。その後常法通りにキット添付の大腸菌 T o p 1 0 に形質転換し、L B (A m p +) プレート (1 0 0  $\mu$  g / m l のアンピシリンを含有する) に播いた。得られた各コロニーから常法通りにプラスミド抽出し、蛍光シークエンサー (A B I 社) を用いてサイクルシーケンス法による塩基配列の決定を行った。得られた各クローンの配列を G e n B a n k で相同性を調べ、未知であったクローン、B S S P 6 遺伝子について 5 ' R A C E 、 3 ' R A C E 法により c D N A 全長を得、上記法と同じく塩基配列の決定を行った。これらについて、ノザン・ブロット解析を行った結果、脳および前立腺に強力な発現が認められた。さらに、脳と前立腺の m R N A の大きさが異なっていた。そこで、B S S P 6 クローン特異的プライマー、G S P 1 プライマー (hBSSP6F1 (配列番号 1 8) または

hBSSP6R2 (配列番号 24)、および GSP2 プライマー (hBSSP6F2 (配列番号 19) または hBSSP6R1 (配列番号 23)) を作製し、human brain Marathon-Ready cDNA (Clontech社) および human prostate Marathon-Ready cDNA (Clontech社) を用いてそれぞれこの試薬に付属する AP1 プライマーと上記 GSP1 プライマーのいずれかで 94℃、2分を 1 サイクル、94℃、30秒、60℃、30秒、72℃、30秒を 35 サイクルする PCR を行った。次に、この PCR 産物を 1/100 に希釈したものを 5  $\mu$  l、10 $\times$ バッファーを 5  $\mu$  l、dNTP を 5  $\mu$  l、10  $\mu$  M の上記 GSP2 プライマーのいずれかを 10 pmo l、試薬に付属する AP2 プライマーを 10 pmo l、ExTaq を 0.5 ユニット、滅菌水で全量を 50  $\mu$  l とし、先と同様に PCR を行った。この PCR 産物を上記 TOPOTA クローニングキットを用いてクローニングし、シーケンスを行い前記クローンの上流、下流領域を得た。この際、タンパク質の全長をカバーしていないと思われるクローンについては更に、新たに判明した塩基配列に基づいて特異的プライマーを作製した。またこの配列を基にして ORF を増幅できるような表 1 に示すプライマー (脳型 (brain) および前立腺型 (pros.) hBSSP6 の各々の mRNA を増幅するために異なる Forward プライマーを設計した) を作製し、human brain Marathon ready cDNA および human prostate Marathon ready cDNA を鋳型として PCR を行い同一クローンであることを確認し、これを TOPOTA クローニングキットに添付の pCRII-TOPO ベクターにクローニングし、全長の cDNA クローンが入ったプラスミド pCRII/hBSSP6 を得た。同様に GSP1、GSP2 を mouse brain Marathon-Ready cDNA (Clontech社) を鋳型にして 5' RACE、3' RACE 法を行い、クローニングしてマウスの相同性のある遺伝子 pCRII/mBSSP6 を得た。配列番号 1 および 3 に hBSSP6 および mBSSP6 をコードする cDNA の塩基配列を、配列番号 2 および 4 にこれらの塩基配列から推定される hBSSP6 タンパク質および mBSSP6 のアミノ酸配列を示す。

表 1

配列番号	プライマー名	向き	配 列	用途
human BSSP6				
1 8	hBSSP6F1	Forward	TCAAGCCCCGCTACATAGTT	RACE
1 9	hBSSP6F2	Forward	ATCATGCTGGTGAAGATGGC	RACE
2 0	hBSSP6F3	Forward	GGA CTCAAGAGAGGAACCTG	全長用 (brain)
2 1	hBSSP6F4	Forward	ATCATCAAGGGGTTCGAGTG	mature
2 2	hBSSP6F5	Forward	CTGCCTTGCTCCACACCTGG	全長用 (pros.)
2 3	hBSSP6R1	Reverse	TTCTCACACTTCTGGTGCTC	RACE
2 4	hBSSP6R2	Reverse	ATGGTGTCTGTGATGTTGCC	RACE
2 5	hBSSP6R3/P	Reverse	AACTGCAGGAACCAACACCAAGTGG	全長用
mouse BSSP6				
2 6	mBSSP6F1	Forward	CGACTTCAACAACAGCCTCC	RACE
2 7	mBSSP6F2	Forward	CTTCTTTACCCGAGCTGTGC	RACE
2 8	mBSSP6F3	Forward	TAAGCTAGGAGAACTGAGGC	全長用 (pros.)
2 9	mBSSP6F4	Forward	ATCAAGGGTTATGAGTGC	mature
3 0	mBSSP6F5	Forward	CTTACAGGCTTGGGGATTG	全長用 (brain)
3 1	mBSSP6R1	Reverse	GATGATGCCTTGAAGAGATC	RACE
3 2	mBSSP6R2	Reverse	CATGGTGTCTGTGATGTTGCC	RACE
3 3	mBSSP6R3/E	Reverse	CGGAATTTCGCATTAAGAAGAGGTTGGAG	全長用

実施例 2 h B S S P 6 もしくは m B S S P 6 遺伝子のヒトおよびマウス臓器での発現

- 5 B a l b / c マウスあるいはその胎児の各種臓器ならびにヒトの各種組織から、QuickPrep Micro mRNA purification Kit (Amersham-Pharmacia) のプロトコルに従い、mRNAを単離した。これらを常法通りに電気泳動し、ナイロンメンブ
- 10 ランに転写した。このフィルターを p C R I I / m B S S P 6 および p C R I I / h B S S P 6 より m B S S P 6 の成熟体をコードする部分 (配列番号 3、塩基番号 2 4 4 ~ 9 3 0) および h B S S P 6 の成熟体をコードする部分 (配列番号 1、塩基番号 2 7 2 ~ 9 5 8) をそれぞれ単離・精製し、 $\alpha - ^{32}P$  d C T P で標識したプローブを  $5 \times S S C$  で希釈したものと、 $65^{\circ}C$  で一昼夜反応させた。同様に、human multiple tissue blot、human multiple tissue blot II、human brain multiple tissue blot II、human brain multiple tissue blot IV
- 15 (Clontech社製) 膜を p C R I I / h B S S P 6 の成熟体をコードする部分を単離・精製し、 $\alpha - ^{32}P$  d C T P で標識したプローブを  $5 \times S S C$  で希釈したも

のと、65℃で一昼夜反応させた。その後、フィルターを2×SSC/0.1% SDSで室温30分間、1×SSC/0.1% SDSで室温30分間、0.1×SSC/0.1% SDSで65℃30分間で2回洗い、FLA 2000用イメージングプレート（富士フイルム社）に1日露光させ、解析した。human multiple tissue blot膜（図1）、human multiple tissue blot II（図2）、human brain multiple tissue blot II（図3）、human brain multiple tissue blot IV（図4）、ヒトの精巣、前立腺および粘液腺から調製したmRNA（図5）、15日目のマウス胎児、生後12日および1年のマウスの脳から調製したmRNA、生後3ヶ月のマウスの前立腺、精巣、胎盤から調製したmRNA（図6）を用いた結果を示す。また、上記で作製したmRNAをReady To Go RT-PCR Beads（Amersham-Pharmacia）を用いてキット添付のプロトコール通りにhBSSP6およびmBSSP6について遺伝子特異的プライマー（配列番号18および25）を用いてRT-PCRを行った。図1～図6に示すように、ノザン・ブロット解析の場合、hBSSP6は脳の各種部位、胎盤、肺、心臓、精巣、前立腺、粘膜腺等で発現を示し、mBSSP6は胎児の脳、前立腺および精巣で発現が認められた。また、RT-PCR解析の場合、hBSSP6は成体の海馬および前立腺で発現が認められ、mBSSP6は新生児から生後12日マウスの脳および前立腺で発現が認められた。ゆえに、胎盤、肺、心臓、精巣、前立腺、粘膜腺および脳において、本新規セリンプロテアーゼが様々な役割を担っていると予想される。

実施例3 hBSSP6もしくはmBSSP6遺伝子がコードする新規セリンプロテアーゼ成熟タンパク質の発現

（1）発現プラスミドの構築

プラスミドpCRII/hBSSP6またはpCRII/mBSSP6をテンプレートに、hBSSP6タンパク質またはmBSSP6タンパク質の成熟体タンパク質をコードするcDNA領域（ヒト：配列番号1、塩基番号272～958；マウス：配列番号3、塩基番号244～930）をPCR反応にて増幅した（ヒトについては配列番号21および配列番号25の配列を有するプライマーを、

マウスについては配列番号 29 および配列番号 33 の配列を有するプライマーを使用した)。この PCR 産物をそれぞれ pTrc-HisB (Invitrogen) を BamHI で消化後、マングベーン・ヌクレアーゼで平滑末端にしたものに常法通りにライゲーションし、大腸菌 JM109 を形質転換させ、生じたコロニーを PCR 法にて解析して目的とするセリンプロテアーゼ発現プラスミド pTrcHis/hBSSP6 および pTrcHis/mBSSP6 を含む大腸菌を得た。

得られた大腸菌は、それぞれ E. coli pTrcHis/hBSSP6 および E. coli pTrcHis/mBSSP6 と命名し、1998 年 10 月 29 日より、受託番号 FERMP-17039 および FERMP-17036 の下、日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1-3 通商産業省工業技術院生命工学技術研究所に寄託してある。

## (2) 発現プラスミドを含む大腸菌でのタンパク発現

発現プラスミドを持つ大腸菌のシングルコロニーを 10 ml の LB (Amp+) 培地に接種し、一晚 37℃ で培養した。これを 250 ml の LB (Amp+) 培地に接種し、37℃ で培養した。600 nm の吸光度が 0.5 になった時、250  $\mu$ l の 0.1 M IPTG (イソプロピルー  $\beta$ -D (-) チオガラクトピラノシド) を加え、更に 5 時間培養した。この大腸菌を遠心分離後、菌体破壊バッファー (10 mM リン酸バッファー pH 7.5、1 mM EDTA) で懸濁し、氷上で超音波処理を行うことで大腸菌を破壊し、14,000 rpm、4℃ で 20 分遠心して沈殿を得た。この沈殿物を 0.5% Triton X-100 を含む菌体破壊バッファーで 2 度洗浄し、Triton X-100 を取り除くために水洗した後に 8 M の尿素を含む変性バッファー (8 M 尿素、50 mM Tris、pH 8.5、20 mM 2ME) で 37℃ で 1 時間浸透することで溶解した。この溶解液を TALON metal affinity resin (Clontech 社製) に通し、10 mM イミダゾール含有変性バッファーで洗浄後、100 mM イミダゾール含有変性バッファーで溶出し、精製した。この精製物を PBS で一晚おきにバッファー交換しながら 3 日間透析し、タンパク質 hBSSP6-His および mBSSP6-His を得た。

実施例4 BSSP6遺伝子がコードする新規セリンプロテアーゼ成熟タンパク質のpFBTrypSigTag/BSSP6を用いた発現および酵素活性の測定

(1) pFBTrypSigTag/BSSP6の作製

5 配列番号7および8の配列を有するオリゴヌクレオチドをアニールさせてNheIとBamHI消化したフラグメントをNheI-BamHI消化したpSecTag2A (Invitrogen社製)に挿入し、pSecTrypHisとした。5  $\mu$ gのpSecTrypHisベクターに対して20単位のBamHIを加え、37℃で4時間かけて切断した後、6単位のマングビーンヌクレアーゼ (宝酒造)を加えて室温(25℃)で30分間反応させて末端を平滑化した。更に、20単位のXhoIでクローニングサイトの3'側を切断した後、1単位のbacterial alkaline phosphatase (宝酒造)を加えて65℃で30分反応した。

特開平9-149790または Biochim. Biophys. Acta, 1350, 11, 1997 に記載されている方法に準じて、COLO201細胞よりmRNAを調製し、cDNAを合成し、プラスミドpSPORT/ニューロシンをクローニング得た。pSPORT/ニューロシンより、配列番号9および10の配列を有するプライマーを用いてPCRを行い、ニューロシン活性型領域のcDNAを得た。このPCR産物の3'側のXhoIサイトを10unitのXhoIで、37℃、3時間反応させることにより切断した。これとpSecTrypHisをTAKARAライゲーションキットを用いて挿入し、pSecTrypHis/ニューロシンを得た(図7)。

25 配列番号11及び12の配列を有するプライマーを用いてpSecTrypHis/ニューロシンのトリプシンシグナルからエンテロキナーゼ認識部位までの部分にLeu-Val-His-GlyのペプチドがC末端にくるように増幅する。これをpSecTag2AのNheIとHindIIIサイトに挿入しプラスミドpTrypSigを作製した。

プラスミドpSecTag2Aの1  $\mu$ g (0.1  $\mu$ l)を制限酵素NheIおよびBamHIで処理することにより、IgGkのリーダー配列をコードする領域を完全に除去した。この溶液に対して、配列番号38および39の配列を有す

るDNAをそれぞれ100 pmol ずつ加え、70℃で10分間熱処理した後  
室温で30分間放置してアニーリングした。NheIとBamHIで処理したH  
is分泌シグナル配列とpSecTag2A 1μl ずつにDNAライゲーション  
キットVer. 2 (宝酒造株式会社) のI液を2.0μl 加え、16℃で、3  
0分間反応させた。

反応液に大腸菌コンピテントセルXL1-Blue (STRATAGENE社) 0.1m  
lを加え、氷上で30分間反応させた後、42℃で、60秒間熱ショックを与え  
た。2分間氷上に置いた後、SOC培地 (東洋紡績株式会社) を0.9ml 加え、  
37℃で、1時間シェーカーで振とう培養した。5,000 rpmで1分間遠心  
分離して、上清を廃棄した。遠心管内に残った溶液で沈殿したコンピテントセル  
を懸濁し、100μg/ml のアンピシリンを含むアンピシリンLBプレートに  
播いた。37℃で、1晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドのうち、  
His分泌シグナルのDNAが挿入されているものをPCRで選択し、それをp  
TrypHisとした。

pTrypHisのHis Tag領域を含むおよそ200bpを配列番号1  
2及び13の配列を有するプライマーを用いて増幅し、HindIIIとBamH  
Iによる消化で生じたHis Tagとエンテロキナーゼ認識部位を含むおよそ  
40bpの断片をpTrypSigに挿入してpTrypSigTagを作製し  
た (図8A)。

pTrypSigTagのトリプシンシグナル配列からエンテロキナーゼ認識  
部位までを配列番号10と14の配列を有するプライマーを用いたPCRによっ  
て作製したcDNAをBglIIとBamHI消化によって切り出し、pFast  
BAC1 (GIBCO) のBamHIサイトに挿入した。挿入方向を配列番号10  
と15の配列を有するプライマーを用いたPCRによって確認し、ポリヘドリン  
プロモーターによって転写・翻訳される方向に挿入されたクローンを選択し、p  
FBTrypSigTagとした。

5μgのpFBTrypSigTagベクターに対して20単位のBamHI  
を加え、37℃で4時間かけて切断した後、6単位のマングベーンヌクレアーゼ  
(宝酒造) を加えて室温 (25℃) で、30分間反応させて末端を平滑化した。更に、



20単位のE c o R Iでクローニングサイトの3'側を切断した後、1単位の細菌アルカリホスファターゼ（宝酒造）を加えて65℃で30分反応した。

E. c o l i p T r c H i s / h B S S P 6（受託番号F E R M P - 1 7 0 3 9）から得られるp T r c H i s / h B S S P 6またはp C R I I / h B S S P 6より配列番号16および配列番号17の配列を有するプライマーを用いてP C Rを行い、h B S S P 6の活性体領域のc D N Aを得た。得られたc D N Aをp F B T r y p S i g T a gに挿入しp F B T r y p S i g T a g / h B S S P 6を得た（図7B）。この際、蛍光標識した配列番号11の配列を有するプライマーを用いて塩基配列を決定することにより、正しくh B S S P 6が挿入されているかを確認した。E. c o l i p T r c H i s / m B S S P 6（受託番号F E R M P - 1 7 0 3 6）から得られるp T r c H i s / m B S S P 6または実施例1で得たp C R I I / m B S S P 6を用いて同様にm B S S P 6の活性体領域のc D N Aを得て、以下と同様の方法により、m B S S P 6を発現させることができる。

p F B T r y p S i g T a g / h B S S P 6をGibco BRL BAC-T0-BAC baculovirus expression systemのプロトコールに従ってバクミドDNA上にTrypsinogen signal peptide、H i s t a g及びエンテロキナーゼ認識部位を融合したキメラh B S S P 6を持つ組み換えバクミドを作製した。これをBAC-T0-BAC baculovirus expression systemのマニュアルに従いS f - 9細胞で発現させたところ、ウィルス感染後2日目より培養上清中に分泌された。

## （2）酵素活性の測定

この培養上清中に得られた組換え融合タンパク質h B S S P 6をキレートカラムに通し精製し、透析後、酵素活性を測定した。まず、培養上清をP B Sバッファーを用いてキレートカラム（N i - N T A - A g a r o s e, Q i a g e n社製）に供し、P B Sにイミダゾール（和光純薬工業）を溶解した溶液で段階的に溶出した。得られたイミダゾール溶出分画を、さらにP D - 1 0カラム（P h a r m a c i a社製）でP B Sバッファーに交換した。このサンプル50μLにエンテロキナーゼ（1U/1μL, I n v i t r o g e n社製）10μLを混和し、室温で60分反応させた。次に各種合成基質（ペプチド研究所）をDMSOに溶

解し、1M Tris-HCl (pH 8.0) で希釈した0.2M基質溶液を50  $\mu$ L加え、さらに、37°Cで反応した。1時間後に励起波長380nm、蛍光波長460nmにおける、酵素作用に生じるAMC (7-アミノ-4-メチルクマリン) の蛍光を測定することにより、活性を測定した(図9)。なお、図に示した値は、エンテロキナーゼのみの蛍光値を差し引いた値を示している。

#### 実施例5 抗hBSSP6抗体の作製

以下の手順に従って、抗hBSSP6抗体を作製した。

##### (1) 免疫処置

8週齢の雌性Balb/cマウス5匹に対し、実施例4にて得た組み換えhBSSP6タンパク質溶液をフロイント完全アジュバント(DIFCO社製)と1:1で混和しエマルジョン化したものを、組み換えhBSSP6タンパク質が約100  $\mu$ g/匹となるよう皮下注射した。以後、ほぼ2週間毎に3回追加免疫を行い、免疫用抗原溶液をフロイント不完全アジュバント(DIFCO社製)と1:1で混和しエマルジョン化したものを組み換えhBSSP6タンパク質が約100  $\mu$ g/匹となるよう調製し、皮下注射した。2回目の追加免疫の3日後に尾静脈より採血し、血清中の抗体価をELISA法により測定した。高い抗体価を有していたマウスについて、3回目の追加免疫の2週間後に生理食塩液に溶解した組み換えhBSSP6タンパク質が約100  $\mu$ g/匹となるよう腹腔内投与し、その3日後に免疫したマウスの脾臓細胞を細胞融合に用いた。

##### (2) ELISA法(直接固相法)

免疫用抗原と同様の方法で調製した組み換えhBSSP6タンパク質のタンパク質溶液をPBSで5  $\mu$ g/mLに調製し、50  $\mu$ L/ウェルでELISAプレートに2時間吸着させた。精製水で5回洗浄後、PBSで4倍に希釈したブロックエース(雪印乳業社製)でブロッキングを行った。その後洗浄し、(1)で得られた血清を血清希釈用バッファー(5% FBSを含むPBS)で5,000倍に希釈し、50  $\mu$ L/ウェルずつ加え、室温で2時間反応させた。プレートを洗浄後、2000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識マウスIgG抗体(ICN/Cappel社製)を50  $\mu$ L/ウェルずつ加え、室温で1時間反応させた。p

ーニトロフェニルホスフェート二ナトリウム (Nitrophenyl Phosphate, Disodium, SIGMA 104 phosphatase substrate tablets) を基質反応液 (0.5 mM 塩化マグネシウムを含む 9.6% ジエタノールアミン緩衝液 (pH 9.7)) に 2 mg/mL の濃度になるよう溶解し、基質溶液を調製した。精製水で 7 回プレートを洗淨し、該基質溶液を 50  $\mu$ L/ウェルとなるように加えた。該基質溶液と 30 分間反応させた後、50  $\mu$ L の 3N NaOH を加え反応を停止させ、405 nm の吸光度を測定した。

### (3) 細胞融合、ハイブリドーマの作製

(2) の ELISA 法の結果により組み換え hBSSP6 タンパク質に対する抗体価の上昇が認められたマウス 3 匹から最終免疫の 3 日後に脾臓を摘出し、常法により脾細胞を調製した。

細胞融合時の親株は、事前に 20  $\mu$ g/mL の 8-アザグアニンを含む培地で選択し、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT) 欠損株であることを確認した Balb/c マウス由来ミエローマ SP2 細胞株を用いた。SP2 細胞  $2 \times 10^7$  個と脾細胞  $1 \times 10^8$  個をあわせ、ポリエチレングリコール 4000 (PEG 4000; Merck 社製) を細胞融合促進剤として使用し、常法に従い細胞融合を行った。融合後の細胞は脾細胞換算で  $3.0 \times 10^8$  個/mL になるようにエスロン培地 (三光純薬製) にヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジンを加えた培地 (HAT 培地) に懸濁し 96 ウェルマイクロプレート (Corning 社製) に 100  $\mu$ L/ウェルずつ分注した。該融合細胞を CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C、5% CO<sub>2</sub>) で 3~5 日毎に半量ずつ培地交換を行いながら培養した。HAT 培地で培養可能なハイブリドーマのみ選択培養した。

### (4) ハイブリドーマのスクリーニング

コロニー形成の確認されたウェルについて、培養上清中の組み換え hBSSP6 タンパク質に対して特異的に反応する抗体の有無を確認するために、(2) で示したのと同じ ELISA 法でプレートに組み換え hBSSP6 タンパク質および組み換え hBSSP6 タンパク質そしてトリプシノーゲンの三種類を用い、スクリーニングを行い、組み換え hBSSP6 タンパク質のみに強く反応するコロ

ニーを選択し、クローニングに供した。

(5) ハイブリドーマのクローニング

組み換え h B S S P 6 タンパク質に対して結合する抗体を産生するハイブリドーマについて限界希釈法によるクローニングを 3 回繰り返し行い、組み換え h B S S P 6 タンパク質に対して特異的に結合する抗体を産生し、且つ安定した増殖能を有するハイブリドーマ F B 6 M A 1 1 細胞株および F B 6 M A 5 3 細胞株の 2 種を得た。

(6) モノクローナル抗体のタイピング

上記で得られた 2 種のハイブリドーマ F B 6 M A 1 1 細胞株およびハイブリドーマ F B 6 M A 5 3 細胞株の培養上清 0. 5 m L を用いて Mouse Antibody Isotyping kit (Gibco BRL 社) を用いてアイソタイプを調べた。2 種のハイブリドーマ F B 6 M A 1 1 細胞株および F B 6 M A 5 3 細胞株が産生するモノクローナル抗体のアイソタイプは、両者とも H 鎖は I g G 1、L 鎖は  $\kappa$  であった。

(7) モノクローナル抗体の調製と精製

8 週齢の雌性 B a l b / c マウスに 0. 5 m l / 匹のプリスタンを経口投与し、その 10 日後に上記 d のクローニングで得られた 2 種のハイブリドーマ 2 B 2 - 6 細胞株および S 2 E 5 細胞株をそれぞれ 1 匹あたり約  $10^7$  細胞数 / 0. 5 m l / 匹で腹腔内に注入した。10 日後頃からマウスの腹部肥大を認めたため、18 G の注射針を用いて腹水を採取した。採取した腹水は、1, 000 r p m、4°C にて 10 分間遠心分離し、その上清を 37°C、30 分間放置した後、4°C で一晩静置した。12, 000 r p m、4°C で 10 分間遠心分離後、得られた上清をアフィニティーカラム Sepharose Protein A (Pharmacia biotech 社製) を用いて各モノクローナル抗体を精製した。この抗体溶液の 260、280、320 n m における吸光度を測定し、werbulg-christian 法により抗体濃度を測定した。

(8) ウエスタンブロッティング

組み換え h B S S P 6 タンパク質 (プロ体および成熟体)、トリプシノーゲン、そして、ヒトカリクレインを等量の 2×SDS loading buffer (第一化学社製) と混合したものをサンプル溶液とした。該サンプル溶液を SDS 電気泳動装置 (第一化学社製) およびトリス-グリシンバッファー (第一化学社製) を用いて

10-20%ポリアクリルアミドゲル（第一化学社製）で電気泳動した。

一方、泳動中、ブロット用に3MM濾紙（Whatman社製）をbuffer A（第一化学社製）に2枚、buffer B（第一化学社製）に1枚、buffer C（第一化学社製）に3枚浸した。またポリビニリデンジフルオライド膜（PVDF膜：Millipore社製）をメタノールに浸した後、精製水に浸し水になじませた。タンパク質のPVDF膜への転写は、電気泳動後ゲルを装置から取り出し、ブロッター（ファルマシア社製）に陽極側からbuffer Aに浸した2枚の濾紙、buffer Bに浸した1枚の濾紙、PVDF膜、ゲル、およびbuffer Cに浸した3枚の濾紙を記載の順に置き、8mVで1.5時間で行った。転写後、PVDF膜をブロックエース（雪印乳業社製）で室温で1時間振とうすることによりブロッキングした。その後、該膜を（7）で得られた精製抗体二種類を5%牛胎児血清添加PBSで希釈したものと4℃で一晩反応させた。その後、アルカリフォスファターゼ標識マウスIgG抗体を加え、室温で1時間反応後、NBT-BCIP溶液で発色させ、培養上清中組み換え体ヒトBSSP6タンパク質の発現を確認した（図10）。

#### 実施例6 ヒトBSSP6変異型のクローニング

ヒト前立腺癌細胞株PC-3より常法にしたがい、polyA+RNAを調製した。これをoligo dTをプライマーとしてSuperscript II（Gibco BRL）を用いて逆転写してcDNAを合成した。これを鋳型に、配列番号20および34をプライマーにPCR反応を行った。反応は95℃2分の後、95℃にて30秒、56℃にて30秒、72℃にて30秒を35サイクル行った。得られたPCR産物をTOPO TAクローニングキットを用いてクローニングし、シーケンスを行ったところ変異型hBSSP6の当該配列を見いだした。変異型hBSSP6をコードする塩基配列を配列番号5に、この塩基配列から推定される変異型hBSSP6タンパク質のアミノ酸配列を配列番号6に示す。なお配列番号5において、139位のアミノ酸Cysをコードする528～530位の塩基配列が「tgt」のものと「tgc」のものの2種類が存在した。従って、配列番号5の530位の塩基は、「tまたはc」を示す「y」によって表されている。配

列番号 20 と 25 を用いて変異型の全長を含む cDNA をクローン化し、プラスミド pCRII/hBSSP6 variant type を得た。

表 2

配列番号	プライマー名	向き	配 列	用途
20	hBSSP6F3	Forward	GGAAGAGAGAGGAACCTG	全長用
34	hBSSP6R3	Reverse	ATGCTGTCTGTGATGTTGCC	一部用
25	hBSSP6R3/P	Reverse	AACTGCAGGAACCAACACCAAGTGG	全長用

#### 実施例 7 RT-PCR による hBSSP6 mRNA の発現解析

Clontech 社より購入したヒト各種臓器の polyA+RNA を鋳型に Superscript II (Gibco BRL 社) を用いて oligo dT プライマーによって逆転写反応を行い、cDNA を得た。逆転写反応は Gibco BRL 社のマニュアルにしたがい、55℃ で行った。この cDNA を鋳型に活性体を増幅するプライマーを用いて、95℃ にて 30 秒、60℃ にて 30 秒、72℃ にて 30 秒を 35 サイクルの PCR 反応を行った。PCR 産物を 1% アガロースゲル電気泳動で解析したところ、成人海馬、唾液腺、甲状腺、乳腺、肺、前立腺、精巣で発現が認められた (図 11)。

#### 実施例 8 大腸菌による hBSSP6 変異型の発現

プラスミド pCRII/hBSSP6 variant type をテンプレートに、配列番号 21 と 25 をプライマーとして hBSSP6 変異型タンパク質成熟体タンパク質をコードする cDNA 領域を PCR 反応にて増幅した。この PCR 産物をそれぞれ pTrc-HisB (Invitrogen) を BamHI で消化後、マングビーン・ヌクレアーゼで平滑末端にしたものに常法通りにライゲーションし、大腸菌 DH5α を形質転換させ、生じたコロニーを PCR 法にて解析して目的とするセリンプロテアーゼ発現プラスミド pTrcHis/hBSSP6 variant type を含む大腸菌を得た。得られた大腸菌は、E. coli pTrcHis/hBSSP6 variant type と命名した。

発現プラスミドを持つ大腸菌のシングルコロニーを 10ml の LB (Amp

+) 培地に接種し、一晚 37°C で培養した。これを 250 ml の LB (Amp

+) 培地に接種し、37°C で培養した。600 nm の吸光度が 0.5 になった時、  
250  $\mu$ l の 0.1 M IPTG (イソプロピルー  $\beta$ -D (-) チオガラクトピ  
ラノシド) を加え、更に 5 時間培養した。この大腸菌を遠心分離後、菌体破壊バ  
5 ュッファー (10 mM リン酸バッファー pH 7.5、1 mM EDTA) で懸濁し、  
氷上で超音波処理を行うことで大腸菌を破壊し、14,000 rpm、4°C で 2  
0 分遠心して沈殿を得た。この沈殿物を 0.5% Triton X-100 を含  
む菌体破壊バッファーで 2 度洗浄し、Triton X-100 を取り除くため  
に水洗した後に 8 M の尿素を含む変性バッファー (8 M 尿素、50 mM Tris  
10 s pH 8.5、20 mM 2ME) で 37°C で 1 時間浸透することで溶解した。  
この溶解液を TALON metal affinity resin (Clontech 社製) に通し、10 mM イ  
ミダゾール含有変性バッファーで洗浄後、100 mM イミダゾール含有変性バッ  
ファーで溶出し、精製した。この精製物を抗 hBSSP6 抗体で検出したところ、  
hBSSP6 よりも分子量の大きな変異型特異的なバンドが検出された (図 1  
15 2)。hBSSP6 変異型を、上記実施例 4 に記載の手順に従って、Sf-9 細  
胞を使用して発現させ、その酵素活性を調べることもできる。

表 3

配列番号	プライマー名	向き	配列	用途
21	hBSSP6F4	Forward	ATCATCAAGGGGTTTCGAGTG	一部用

20 実施例 9 RT-PCR とサザンハイブリダイゼーションによる変異型 hBSSP6 mRNA の検出

Clontech 社より購入したヒト各種臓器の poly A+RNA を鋳型に  
Superscript II (Gibco BRL 社) を用いて oligo dT プライマーによって逆  
転写反応を行い、cDNA を得た。逆転写反応は Gibco BRL 社のマニュアルにし  
25 たがい、55°C で行った。この cDNA を鋳型に配列番号 20 および 35 をプラ  
イマーにして、95°C にて 30 秒、60°C にて 30 秒、72°C にて 30 秒を 30  
サイクルの PCR 反応を行った。得られた PCR 産物を常法にしたがってナイロ

ンフィルター (Hybond N+, アマシャム・ファルマシア社) 上にブロットした。この際、pCRII/hBSSP6 variant type を制限酵素 EcoRI で切断したものをコントロールとして同時にブロットした。このメンブランフィルターに対して pCRII/hBSSP6 の全長をコードする部分を  $\alpha$ - $^{32}$ P dCTP で標識したプローブを  $5\times$ SSC で希釈したものと、65°C で一昼夜反応させた。その後、フィルターを  $2\times$ SSC/0.1%SDS で室温30分間、 $1\times$ SSC/0.1%SDS で室温30分間、 $0.1\times$ SSC/0.1%SDS で65°C30分間で2回洗い、FLA 2000用イメージングプレート (富士フィルム社) に1日露光させた。その結果、検討した前立腺癌細胞株 PC-3、DU145、LNCaP、およびヒトの精巣、肺、胎児脳、成人海馬においてその発現が認められた (図13)。

表4

配列番号	プライマー名	向き	配列	用途
35	hBSSP6F7	Forward	CCTCAAGCCGTGGGTGTCAC	一部用

#### 産業上の利用の可能性

本発明によって、単離されたヒトおよびマウスのセリンプロテアーゼ (hBSSP6 および mBSSP6) ポリヌクレオチド、それらの相同体、成熟体、前駆体および多形性変種が提供される。さらに、本発明によって、hBSSP6 および mBSSP6 タンパク質ならびに hBSSP6 および mBSSP6 ポリヌクレオチドおよびタンパク質を含有する組成物、それらの製造方法および使用が提供される。



配列表フリーテキスト

SEQ ID NO: 7: Designed oligonucleotide to construct plasmid  
pSecTrypHis

5 SEQ ID NO: 8: Designed oligonucleotide to construct plasmid  
pSecTrypHis

SEQ ID NO: 9: Designed oligonucleotide primer to amplify  
neurosin-encoding sequence

SEQ ID NO:10: Designed oligonucleotide primer to amplify  
neurosin-encoding sequence

10 SEQ ID NO:11: Designed oligonucleotide primer to amplify a  
portion of plasmid pSecTrypHis/Neurosin

SEQ ID NO:12: Designed oligonucleotide primer to amplify a  
portion of plasmid pSecTrypHis/Neurosin

15 SEQ ID NO:13: Designed oligonucleotide primer to amplify a  
portion of plasmid pTrypHis

SEQ ID NO:14: Designed oligonucleotide primer to amplify a  
portion of plasmid pTrypSigTag

SEQ ID NO:15: Designed oligonucleotide primer to amplify a  
portion of plasmid pFBTrypSigTag

20 SEQ ID NO:16: Designed oligonucleotide primer to amplify active  
hBSSP6-encoding sequence

SEQ ID NO:17: Designed oligonucleotide primer to amplify active  
hBSSP6-encoding sequence

25 SEQ ID NO:18: Designed oligonucleotide primer designated as  
hBSSP6F1 for RACE for human BSSP6 (forward)

SEQ ID NO:19: Designed oligonucleotide primer designated as  
hBSSP6F2 for RACE for human BSSP6 (forward)

SEQ ID NO:20: Designed oligonucleotide primer designated as  
hBSSP6F3 to amplify full-length human brain BSSP6-encoding mRNA

(forward)

SEQ ID NO:21: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6F4 to amplify mature human BSSP6-encoding region (forward)

5 SEQ ID NO:22: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6F5 to amplify full-length human prostate BSSP6-encoding mRNA (forward)

SEQ ID NO:23: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6R1 for RACE for human BSSP6 (reverse)

10 SEQ ID NO:24: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6R2 for RACE for human BSSP6 (reverse)

SEQ ID NO:25: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6R3/P to amplify full-length human BSSP6-encoding mRNA (reverse)

SEQ ID NO:26: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP6F1 for RACE for mouse BSSP6 (forward)

15 SEQ ID NO:27: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP6F2 for RACE for mouse BSSP6 (forward)

SEQ ID NO:28: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP6F3 to amplify full-length mouse prostate BSSP6-encoding mRNA (forward)

20 SEQ ID NO:29: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP6F4 to amplify mature mouse BSSP6-encoding region (forward)

SEQ ID NO:30: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP6F5 to amplify full-length mouse brain BSSP6-encoding mRNA (forward)

25 SEQ ID NO:31: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP6R1 for RACE for mouse BSSP6 (reverse)

SEQ ID NO:32: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP6R2 for RACE for mouse BSSP6 (reverse)

SEQ ID NO:33: Designed oligonucleotide primer designated as

mBSSP6R3/E to amplify full-length mouse BSSP6-encoding mRNA (reverse)

SEQ ID NO:34: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6R3 to amplify a portion of BSSP6 variant type-encoding mRNA from human prostatic cancer cell line PC-3 (reverse)

5 SEQ ID NO:35: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6F7 to amplify a portion of human BSSP6-encoding mRNA (forward)

SEQ ID NO:36: Designed oligonucleotide primer to amplify conserved region of serin proteases-encoding sequence; n is a, c, g or t.

10 SEQ ID NO:37: Designed oligonucleotide primer to amplify conserved region of serin proteases-encoding sequence; n is a, c, g or t.

## 請 求 の 範 囲

1. 配列番号2のアミノ酸番号1～229に示すアミノ酸229個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号2のアミノ酸番号1～229に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸番号1～229に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはその修飾体。  
5
2. 配列番号1の塩基番号272～958に示す塩基配列、配列番号2のアミノ酸番号1～229に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、またはこれらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号2のアミノ酸番号1～229に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。  
10
3. 配列番号4のアミノ酸番号1～229に示すアミノ酸229個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号4のアミノ酸番号1～229に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号4のアミノ酸番号1～229に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはその修飾体。  
15
4. 配列番号3の塩基番号244～930に示す塩基配列、配列番号4のアミノ酸番号1～229に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、またはこれらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号4のアミノ酸番号1～229に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。  
20
5. 配列番号2のアミノ酸番号-53～229に示すアミノ酸282個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号2のアミノ酸番号-53～229に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸番号-53～229に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、  
25

あるいはその修飾体。

6. 配列番号1の塩基番号113～958に示す塩基配列、配列番号2のアミノ酸番号ー53～229に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、またはこれらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号2のアミノ酸番号ー53～229に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

7. 配列番号2のアミノ酸番号ー21～229に示すアミノ酸250個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号2のアミノ酸番号ー21～229に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸番号ー21～229に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはその修飾体。

8. 配列番号1の209～958に示す塩基配列、配列番号2のアミノ酸番号ー21～229に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、またはこれらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号2のアミノ酸番号ー21～229に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

9. 配列番号4のアミノ酸番号ー20～229に示すアミノ酸249個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号4のアミノ酸番号ー20～229に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号4のアミノ酸番号ー20～229に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはその修飾体。

10. 配列番号3の塩基番号184～930に示す塩基配列、配列番号4のアミノ酸番号ー20～229に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、またはこれらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号4のアミノ酸番号ー20～229に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

11. 配列番号4のアミノ酸番号ー47～229に示すアミノ酸276個から成

るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号4のアミノ酸番号ー47～229に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号4のアミノ酸番号ー47～229に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはその修飾体。

12. 配列番号3の塩基番号103～930に示す塩基配列、配列番号4のアミノ酸番号ー47～229に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、またはこれらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号4のアミノ酸番号ー47～229に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

13. 配列番号6のアミノ酸番号1～254に示すアミノ酸254個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号6のアミノ酸番号1～254に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号6のアミノ酸番号1～254に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはその修飾体。

14. 配列番号5の塩基番号114～875に示す塩基配列、配列番号6のアミノ酸番号1～254に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、またはこれらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号6のアミノ酸番号1～254に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

15. 配列番号6のアミノ酸番号ー21～254に示すアミノ酸275個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号6のアミノ酸番号ー21～254に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号6のアミノ酸番号ー21～254に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはその修飾体。

16. 配列番号5の塩基番号51～875に示す塩基配列、配列番号6のアミノ酸番号ー21～254に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、またはこれら

に相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号6のアミノ酸番号ー21～254に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

5 17. 配列番号1に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、配列番号1に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

18. 配列番号3に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、配列番号3に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

10 19. 配列番号5に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、配列番号5に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

20. 請求項2、4、6、8、10、12、14、16～19のいずれか1つに記載の塩基配列を含むことを特徴とするベクター。

15 21. 請求項2、4、6、8、10、12、14、16～19のいずれか1つに記載の塩基配列を発現可能に保持する形質転換細胞。

22. 請求項2、6、8または17のいずれか1つに記載の塩基配列で形質転換した細胞を培養し、産生されたhBSSP6を採取することを特徴とするタンパク質の製造法。

20 23. 請求項4、10、12または18のいずれか1つに記載の塩基配列で形質転換した細胞を培養し、産生されたmBSSP6を採取することを特徴とするタンパク質の製造法。

25 24. 請求項14、16または19に記載の塩基配列で形質転換した細胞を培養し、産生された変異型hBSSP6を採取することを特徴とするタンパク質の製造法。

25. 細胞が大腸菌、動物細胞または昆虫細胞である、請求項22～24のいずれか1つに記載の製造法。

26. BSSP6遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物。

27. BSSP6 遺伝子が BSSP6 をコードする cDNA、ゲノム DNA または合成 DNA である請求項 26 記載のトランスジェニック非ヒト動物。

28. 遺伝子発現調節部位に変異を起こさせることにより発現レベルを変化させた請求項 26 記載のトランスジェニック非ヒト動物。

5 29. BSSP6 遺伝子の機能を欠損させたノックアウトマウス。

30. 請求項 1、3、5、7、9、11、13 または 15 のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはその断片に対する抗体。

31. ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体またはペプチド抗体である請求項 30 記載の抗体。

10 32. ヒト以外の温血動物に請求項 1、3、5、7、9、11、13 または 15 のいずれか 1 つに記載のタンパク質もしくははその断片を投与し、抗体価の認められる該動物を選択し、脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することを含む、請求項 1、3、5、7、9、11、13 または 15  
15 5 のいずれか 1 つに記載のタンパク質もしくははその断片に対するモノクローナル抗体の製造方法。

33. 請求項 1、3、5、7、9、11、13 または 15 のいずれか 1 つに記載のタンパク質もしくははその断片に対する抗体と検体中の該タンパク質もしくははその断片との免疫学的な結合に基づいて、検体中の該タンパク質もしくははその断片  
20 を測定する方法。

34. 請求項 1、5、7、13 または 15 のいずれか 1 つに記載のタンパク質もしくははその断片に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体と標識化抗体とにより、検体中の BSSP6 もしくはその断片を反応させ、生成したサンドイッチ錯体を検出する、検体中の BSSP6 もしくはその断片を測定する方法。

25 35. 請求項 1、5、7、13 または 15 に記載のタンパク質もしくははその断片に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体に対して、標識化 BSSP6 と検体中の BSSP6 もしくはその断片とを競合的に反応させ、抗体と反応した標識化 BSSP6 の量から検体中の BSSP6 もしくはその断片の量を検出する、検体中の BSSP6 もしくはその断片を測定する方法。



36. 検体が体液である、請求項33～35のいずれか1つに記載の方法。

37. 請求項1、3、5、7、9、11、13または15のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片を含む、組織における疾患の診断マーカー。

5 38. 脳における、アルツハイマー病、てんかんの診断に用いる請求項37記載のマーカー。

39. 脳、髄質、前立腺、胎盤、心臓、精巣または肺における、癌、炎症の診断に用いる請求項37記載のマーカー。

40. 精液または精子における、不妊症の診断に用いる請求項37記載のマーカー。

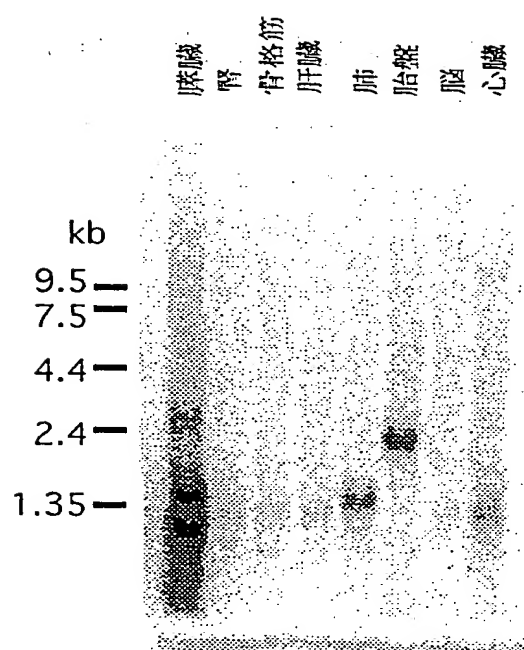
10 41. 前立腺における、前立腺肥大症の診断に用いる請求項37記載のマーカー。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

1/13

図 1

hBSSP-6

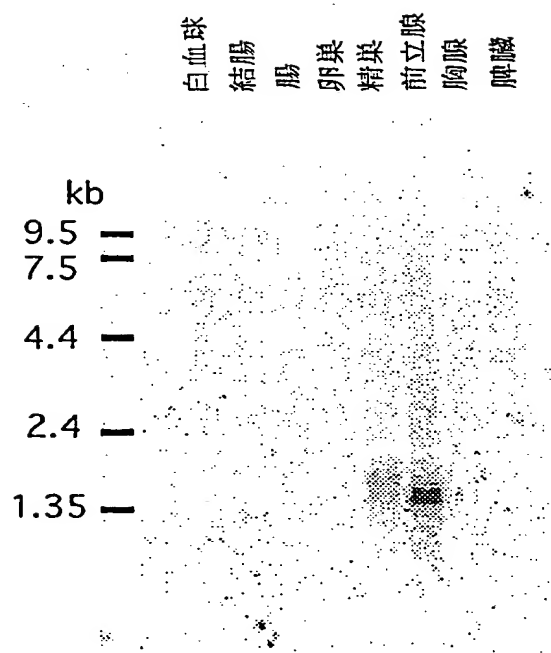


**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

2/13

図 2

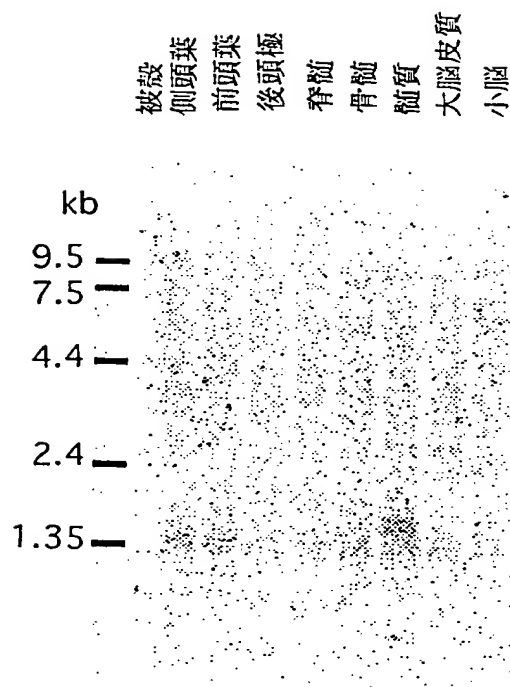
hBSSP-6



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図 3

hBSSP-6

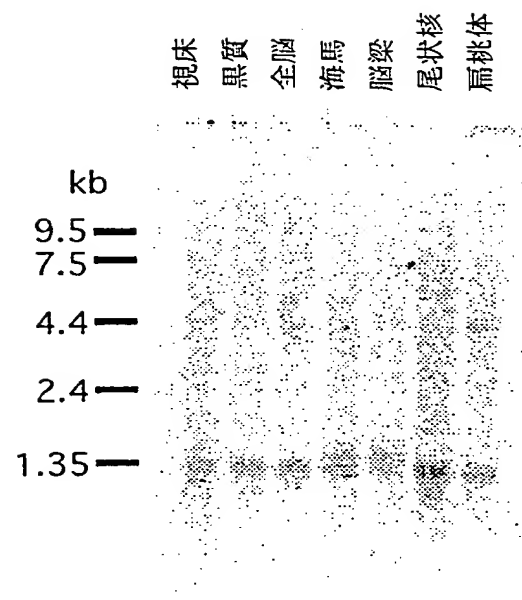


**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



図 4

hBSSP-6

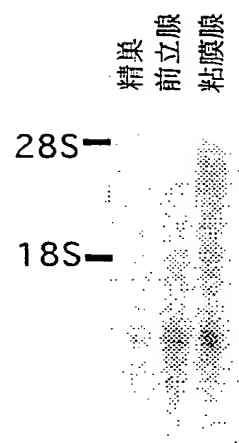


**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

5/13

図 5

hBSSP-6

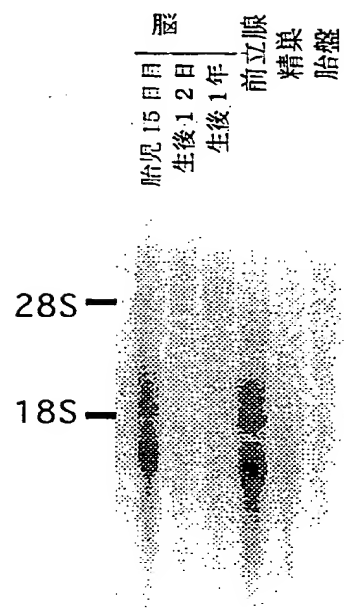


**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

6/13

図 6

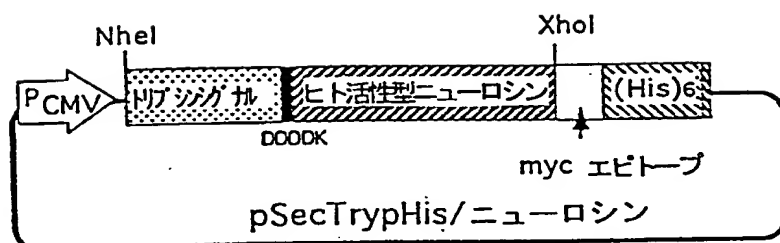
## mBSSP-6



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

7 / 13

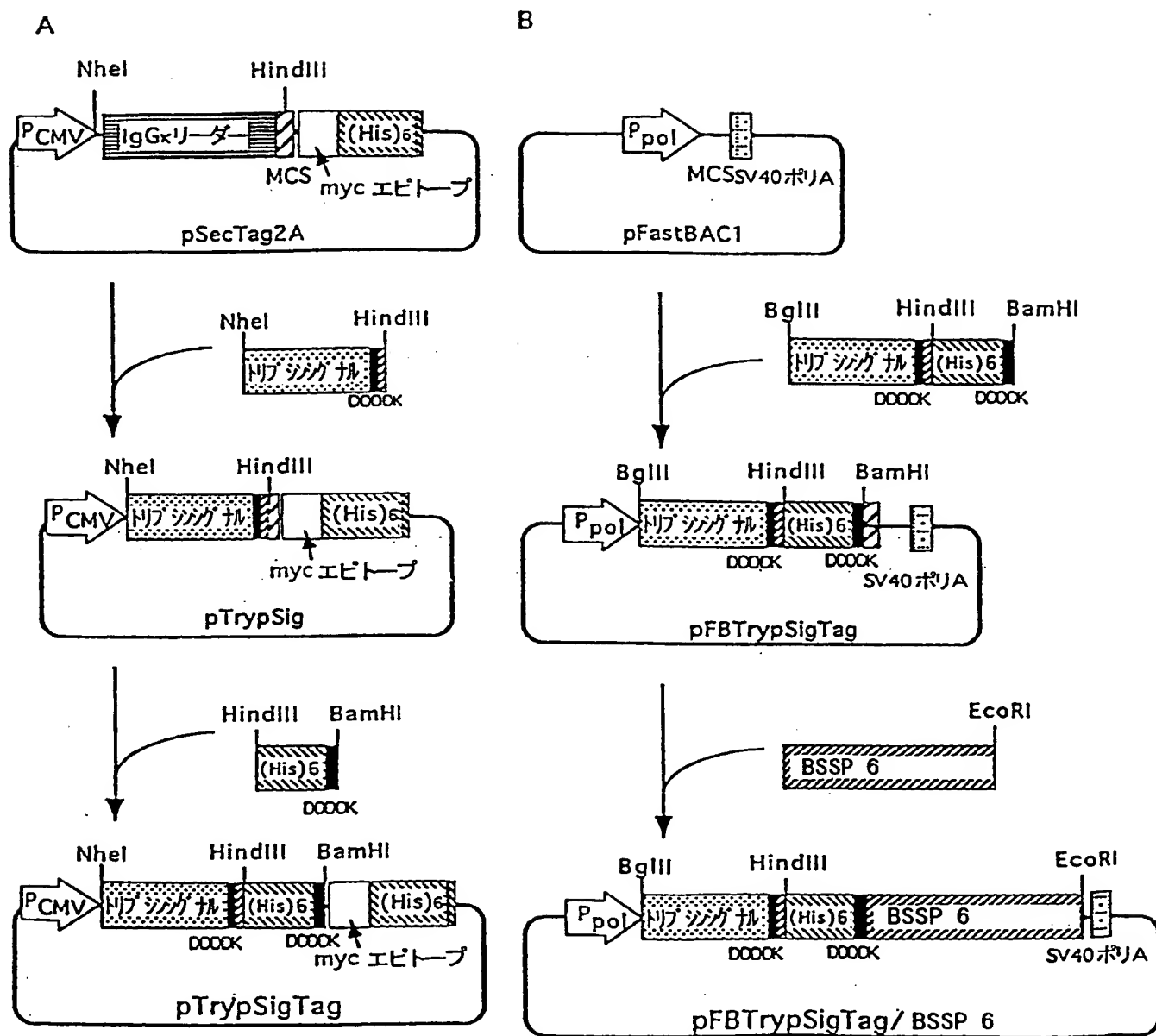
図 7



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

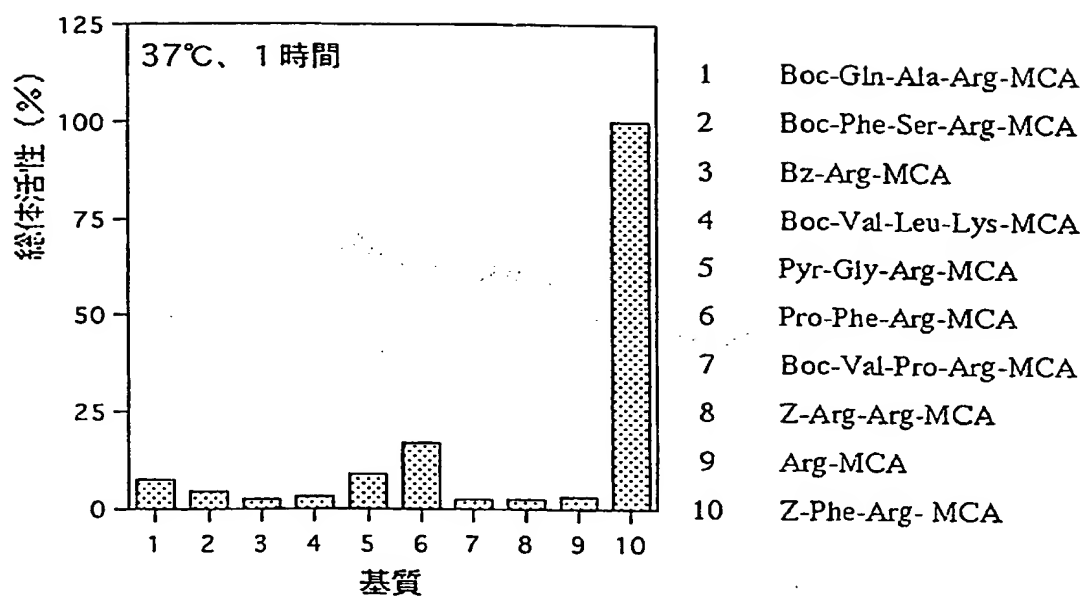


図 8



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図 9



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図 10

α-FB6MA11      α-FB6MA53

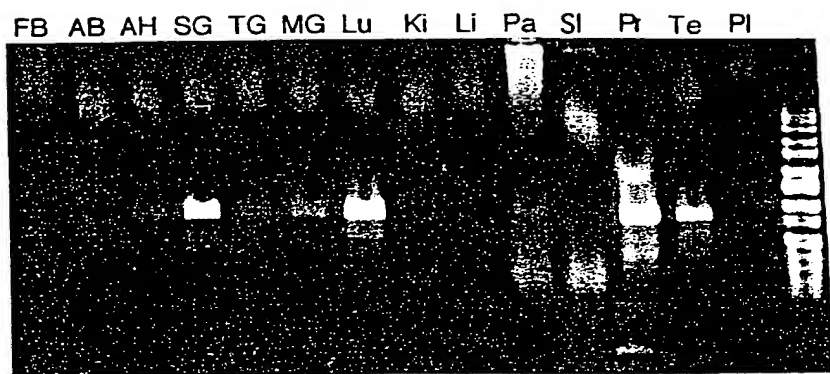
1 2 3 4 M      1 2 3 4

- 1. 組換え体 BSSP6(プロ体)
- 2. 組換え体 BSSP6(成熟体)
- 3. トリプシノーゲン
- 4. カリクレイン

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

11/13

図 1 1



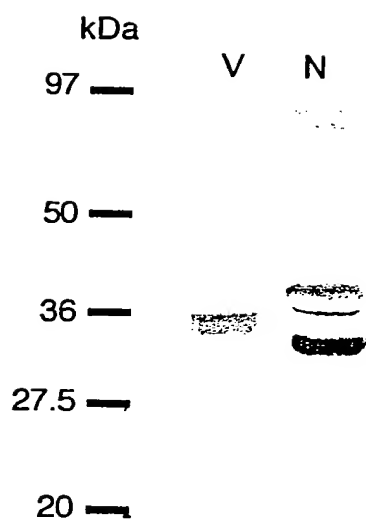
FB; 胎児脳  
AB; 成人脳  
AH; 成人海馬  
SG; 唾液腺  
TG; 甲状腺  
MG; 乳腺  
Lu; 肺  
Ki; 腎  
Li; 肝  
Pa; 膵  
SI; 小腸  
Pr; 前立腺  
Te; 精巣  
PI; 胎盤

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



12/13

図 1 2



V; 変異型hBSSP6

N; 正常hBSSP6

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

13/13

図 1 3

プラスミド PC DU LN Te Lu FB AH



PC; PC-3  
DU; DU145  
LN; LNCaP  
Te; 精巣  
Lu; 肺  
FB; 胎児脳  
AH; 成人海馬

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## SEQUENCE LISTING

<110> Fuso Pharmaceutical Industries Ltd.

<120> Novel serine protease BSSP6

<130> 661641

<150> JP 10-347802

<151> 1998-11-20

<160> 39

<210> 1

<211> 1301

<212> DNA

<213> human

<400> 1

```

ctgccttgct ccacacctgg tcaggggaga gaggggagga aagccaaggg aagggaccta      60
actgaaaaca aacaagctgg gagaagcagg aatctgcgct cgggttccg                    109
cag atg cag agg ttg agg tgg ctg cgg gac tgg aag tca tcg ggc aga ggt      160
    Met Gln Arg Leu Arg Trp Leu Arg Asp Trp Lys Ser Ser Gly Arg Gly
              -50              -45              -40

ctc aca gca gcc aag gaa cct ggg gcc cgc tcc tcc ccc ctc cag gcc atg      211
Leu Thr Ala Ala Lys Glu Pro Gly Ala Arg Ser Ser Pro Leu Gln Ala Met
              -35              -30              -25

agg att ctg cag tta atc ctg ctt gct ctg gca aca ggg ctt gta ggg gga      262
Arg Ile Leu Gln Leu Ile Leu Leu Ala Leu Ala Thr Gly Leu Val Gly Gly
              -20              -15              -10              -5

gag acc agg atc atc aag ggg ttc gag tgc aag cct cac tcc cag ccc tgg      313
Glu Thr Arg Ile Ile Lys Gly Phe Glu Cys Lys Pro His Ser Gln Pro Trp

```

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

2,

-1	1	5	10	
cag gca gcc ctg ttc gag aag acg cgg cta ctc tgt ggg gcg acg ctc atc	364			
Gln Ala Ala Leu Phe Glu Lys Thr Arg Leu Leu Cys Gly Ala Thr Leu Ile				
15	20	25	30	
gcc ccc aga tgg ctc ctg aca gca gcc cac tgc ctc aag ccc cgc tac ata	415			
Ala Pro Arg Trp Leu Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Lys Pro Arg Tyr Ile				
35	40	45		
gtt cac ctg ggg cag cac aac ctc cag aag gag gag ggc tgt gag cag acc	466			
Val His Leu Gly Gln His Asn Leu Gln Lys Glu Glu Gly Cys Glu Gln Thr				
50	55	60	65	
cgg aca gcc act gag tcc ttc ccc cac ccc ggc ttc aac aac agc ctc ccc	517			
Arg Thr Ala Thr Glu Ser Phe Pro His Pro Gly Phe Asn Asn Ser Leu Pro				
70	75	80		
aac aaa gac cac cgc aat gac atc atg ctg gtg aag atg gca tcg cca gtc	568			
Asn Lys Asp His Arg Asn Asp Ile Met Leu Val Lys Met Ala Ser Pro Val				
85	90	95		
tcc atc acc tgg gct gtg cga ccc ctc acc ctc tcc tca cgc tgt gtc act	619			
Ser Ile Thr Trp Ala Val Arg Pro Leu Thr Leu Ser Ser Arg Cys Val Thr				
100	105	110	115	
gct ggc acc agc tgc ctc att tcc ggc tgg ggc agc acg tcc agc ccc cag	670			
Ala Gly Thr Ser Cys Leu Ile Ser Gly Trp Gly Ser Thr Ser Ser Pro Gln				
120	125	130		
tta cgc ctg cct cac acc ttg cga tgc gcc aac atc acc atc att gag cac	721			
Leu Arg Leu Pro His Thr Leu Arg Cys Ala Asn Ile Thr Ile Ile Glu His				
135	140	145	150	
cag aag tgt gag aac gcc tac ccc ggc aac atc aca gac acc atg gtg tgt	772			
Gln Lys Cys Glu Asn Ala Tyr Pro Gly Asn Ile Thr Asp Thr Met Val Cys				
155	160	165		
gcc agc gtg cag gaa ggg ggc aag gac tcc tgc cag ggt gac tcc ggg ggc	823			

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



3.

Ala Ser Val Gln Glu Gly Gly Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly  
 170 175 180  
 cct ctg gtc tgt aac cag tct ctt caa ggc att atc tcc tgg ggc cag gat 874  
 Pro Leu Val Cys Asn Gln Ser Leu Gln Gly Ile Ile Ser Trp Gly Gln Asp  
 185 190 195 200  
 ccg tgt gcg atc acc cga aag cct ggt gtc tac acg aaa gtc tgc aaa tat 925  
 Pro Cys Ala Ile Thr Arg Lys Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Cys Lys Tyr  
 205 210 215  
 gtg gac tgg atc cag gag acg atg aag aac aat tagactggac ccacccacca 978  
 Val Asp Trp Ile Gln Glu Thr Met Lys Asn Asn  
 220 225  
 cagcccatca cctccatctt ccacttggtg tttggttcct gttcactctg ttaataagaa 1038  
 accctaagcc aagaccctct acgaacattc tttgggcctc ctggactaca ggagatgctg 1098  
 tcaacttaata atcaacctgg ggttcgaaat cagtgagacc tggattcaaa ttctgccttg 1158  
 aaatattgtg actctgggaa tgacaacacc tggtttgttc tctgttgtat cccagcccc 1218  
 aaagacagct cctggccata tatcaaggtt tcaataaata tttgctaaat gaaaaaaaaa 1278  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 1301

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 282

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 2

Met Gln Arg Leu Arg Trp Leu Arg Asp Trp Lys Ser Ser Gly Arg Gly  
 -50 -45 -40  
 Leu Thr Ala Ala Lys Glu Pro Gly Ala Arg Ser Ser Pro Leu Gln Ala Met  
 -35 -30 -25  
 Arg Ile Leu Gln Leu Ile Leu Leu Ala Leu Ala Thr Gly Leu Val Gly Gly

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

4.

-20                      -15                      -10                      -5  
 Glu Thr Arg Ile Ile Lys Gly Phe Glu Cys Lys Pro His Ser Gln Pro Trp  
                     -1    1                      5                      10  
 Gln Ala Ala Leu Phe Glu Lys Thr Arg Leu Leu Cys Gly Ala Thr Leu Ile  
      15                      20                      25                      30  
 Ala Pro Arg Trp Leu Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Lys Pro Arg Tyr Ile  
                     35                      40                      45  
 Val His Leu Gly Gln His Asn Leu Gln Lys Glu Glu Gly Cys Glu Gln Thr  
                     50                      55                      60                      65  
 Arg Thr Ala Thr Glu Ser Phe Pro His Pro Gly Phe Asn Asn Ser Leu Pro  
                     70                      75                      80  
 Asn Lys Asp His Arg Asn Asp Ile Met Leu Val Lys Met Ala Ser Pro Val  
                     85                      90                      95  
 Ser Ile Thr Trp Ala Val Arg Pro Leu Thr Leu Ser Ser Arg Cys Val Thr  
      100                      105                      110                      115  
 Ala Gly Thr Ser Cys Leu Ile Ser Gly Trp Gly Ser Thr Ser Ser Pro Gln  
                     120                      125                      130  
 Leu Arg Leu Pro His Thr Leu Arg Cys Ala Asn Ile Thr Ile Ile Glu His  
                     135                      140                      145                      150  
 Gln Lys Cys Glu Asn Ala Tyr Pro Gly Asn Ile Thr Asp Thr Met Val Cys  
                     155                      160                      165  
 Ala Ser Val Gln Glu Gly Gly Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly  
                     170                      175                      180  
 Pro Leu Val Cys Asn Gln Ser Leu Gln Gly Ile Ile Ser Trp Gly Gln Asp  
      185                      190                      195                      200  
 Pro Cys Ala Ile Thr Arg Lys Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Cys Lys Tyr  
                     205                      210                      215  
 Val Asp Trp Ile Gln Glu Thr Met Lys Asn Asn  
                     220                      225

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1323

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; mouse

&lt;400&gt; 3

ccacatctga ctagggaagt aaggcgaagg aggcccatgg aagaaaaatc taaatgaaaa 60

cataagctag gagaactgag gcttcaaacc tgaagctatc ta atg agg agg ctg aag 117

Met Arg Arg Leu Lys

-45

agt gac tgg aaa tta tct aca gaa acc agg gaa cct ggc gcc cgc cct gcc 168

Ser Asp Trp Lys Leu Ser Thr Glu Thr Arg Glu Pro Gly Ala Arg Pro Ala

-40

-35

-30

cta ctc cag gcc agg atg att ctc cga ctc att gca ctt gct ctg gta aca 219

Leu Leu Gln Ala Arg Met Ile Leu Arg Leu Ile Ala Leu Ala Leu Val Thr

-25

-20

-15

-10

ggg cac gta ggg gga gag acg agg atc atc aag ggt tat gag tgc agg cct 270

Gly His Val Gly Gly Glu Thr Arg Ile Ile Lys Gly Tyr Glu Cys Arg Pro

-5

-1 1

5

cac tca cag cca tgg cag gtg gcc ctc ttt cag aag aca cgg ctt ctc tgt 321

His Ser Gln Pro Trp Gln Val Ala Leu Phe Gln Lys Thr Arg Leu Leu Cys

10

15

20

25

ggg gca acc ctc atc gcc ccc aaa tgg ctc ctg aca gca gcc cac tgc cgc 372

Gly Ala Thr Leu Ile Ala Pro Lys Trp Leu Leu Thr Ala Ala His Cys Arg

30

35

40

aag ccc cat tac gtg atc ctc ctt gga gag cac aat cta gag aag aca gac 423

Lys Pro His Tyr Val Ile Leu Leu Gly Glu His Asn Leu Glu Lys Thr Asp

45

50

55

60

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

6.

ggc tgt gag cag agg cgg atg gcc act gag tcc ttc ccc cac ccc gac ttc 474  
 Gly Cys Glu Gln Arg Arg Met Ala Thr Glu Ser Phe Pro His Pro Asp Phe  
                     65                            70                            75  
 aac aac agc ctc ccc aac aaa gac cac cgg aat gac ata atg ctt gtg aag 525  
 Asn Asn Ser Leu Pro Asn Lys Asp His Arg Asn Asp Ile Met Leu Val Lys  
                     80                            85                            90  
 atg tcg tct ccc gtc ttc ttt acc cga gct gtg cag cca ctc acc ctg tcc 576  
 Met Ser Ser Pro Val Phe Phe Thr Arg Ala Val Gln Pro Leu Thr Leu Ser  
                     95                            100                            105                            110  
 cca cac tgt gtc gct gca ggc acc agc tgc ctc att tct gga tgg ggc acc 627  
 Pro His Cys Val Ala Ala Gly Thr Ser Cys Leu Ile Ser Gly Trp Gly Thr  
                     115                            120                            125  
 acg tcc agc ccc cag ttg cgc ctg cct cat tcc ttg cga tgt gcc aat gtc 678  
 Thr Ser Ser Pro Gln Leu Arg Leu Pro His Ser Leu Arg Cys Ala Asn Val  
                     130                            135                            140                            145  
 tcc atc atc gaa cac aag gag tgt gag aag gcc tac ccg ggc aac atc aca 729  
 Ser Ile Ile Glu His Lys Glu Cys Glu Lys Ala Tyr Pro Gly Asn Ile Thr  
                     150                            155                            160  
 gac acc atg ctg tgc gcc agt gtt cgg aaa gag ggc aag gac tcc tgt cag 780  
 Asp Thr Met Leu Cys Ala Ser Val Arg Lys Glu Gly Lys Asp Ser Cys Gln  
                     165                            170                            175  
 ggt gac tct gga ggc ccc ctg gtc tgc aac gga tct ctt caa ggc atc atc 831  
 Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asn Gly Ser Leu Gln Gly Ile Ile  
                     180                            185                            190                            195  
 tcc tgg ggt cag gac cca tgt gcc gtc acc aga aag cct ggt gtc tat aca 882  
 Ser Trp Gly Gln Asp Pro Cys Ala Val Thr Arg Lys Pro Gly Val Tyr Thr  
                     200                            205                            210  
 aaa gtc tgc aaa tac ttt aac tgg atc cac gag gtt atg agg aac aat 930  
 Lys Val Cys Lys Tyr Phe Asn Trp Ile His Glu Val Met Arg Asn Asn

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



215                      220                      225  
 tagaggggac ctgcttccca ccaccaacc cctccaacct cttcttaatg ctttgacttc 990  
 tcttcattct gccctaagaa gtcctcagct gggaccctgg catgtactct ctccgaccca 1050  
 ccatgagtat agtatagga tgctctaact tgatgatcga cctggggcct ggaatcaaat 1110  
 cctgacttga actaaattgt gactctggac atgatcacca ctggttttgt ttgtttggtt 1170  
 gttttttgtt ttgttttgtt ttgttcccag ctttgaagac agtccttggc atatcccagg 1230  
 gtttcaataa atatttgta aatgataaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1290  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 1323

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 276

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; mouse

&lt;400&gt; 4

Met Arg Arg Leu Lys

-45

Ser Asp Trp Lys Leu Ser Thr Glu Thr Arg Glu Pro Gly Ala Arg Pro Ala

-40

-35

-30

Leu Leu Gln Ala Arg Met Ile Leu Arg Leu Ile Ala Leu Ala Leu Val Thr

-25

-20

-15

-10

Gly His Val Gly Gly Glu Thr Arg Ile Ile Lys Gly Tyr Glu Cys Arg Pro

-5

-1 1

5

His Ser Gln Pro Trp Gln Val Ala Leu Phe Gln Lys Thr Arg Leu Leu Cys

10

15

20

25

Gly Ala Thr Leu Ile Ala Pro Lys Trp Leu Leu Thr Ala Ala His Cys Arg

30

35

40

Lys Pro His Tyr Val Ile Leu Leu Gly Glu His Asn Leu Glu Lys Thr Asp

45

50

55

60

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

8

Gly Cys Glu Gln Arg Arg Met Ala Thr Glu Ser Phe Pro His Pro Asp Phe  
                     65                    70                    75  
 Asn Asn Ser Leu Pro Asn Lys Asp His Arg Asn Asp Ile Met Leu Val Lys  
                     80                    85                    90  
 Met Ser Ser Pro Val Phe Phe Thr Arg Ala Val Gln Pro Leu Thr Leu Ser  
                     95                    100                    105                    110  
 Pro His Cys Val Ala Ala Gly Thr Ser Cys Leu Ile Ser Gly Trp Gly Thr  
                     115                    120                    125  
 Thr Ser Ser Pro Gln Leu Arg Leu Pro His Ser Leu Arg Cys Ala Asn Val  
                     130                    135                    140                    145  
 Ser Ile Ile Glu His Lys Glu Cys Glu Lys Ala Tyr Pro Gly Asn Ile Thr  
                     150                    155                    160  
 Asp Thr Met Leu Cys Ala Ser Val Arg Lys Glu Gly Lys Asp Ser Cys Gln  
                     165                    170                    175  
 Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asn Gly Ser Leu Gln Gly Ile Ile  
                     180                    185                    190                    195  
 Ser Trp Gly Gln Asp Pro Cys Ala Val Thr Arg Lys Pro Gly Val Tyr Thr  
                     200                    205                    210  
 Lys Val Cys Lys Tyr Phe Asn Trp Ile His Glu Val Met Arg Asn Asn  
                     215                    220                    225

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 934

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 5

actgggactc aagagaggaa cctggggccc gctcctcccc cctccaggcc

50

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

atg agg att ctg cag tta atc ctg ctt gct ctg gca aca ggg ctt gta ggg 101  
 Met Arg Ile Leu Gln Leu Ile Leu Leu Ala Leu Ala Thr Gly Leu Val Gly  
 -20 -15 -10 -5  
 gga gag acc agg atc atc aag ggg ttc gag tgc aag cct cac tcc cag ccc 152  
 Gly Glu Thr Arg Ile Ile Lys Gly Phe Glu Cys Lys Pro His Ser Gln Pro  
 -1 1 5 10  
 tgg cag gca gcc ctg ttc gag aag acg cgg cta ctc tgt ggg gcg acg ctc 203  
 Trp Gln Ala Ala Leu Phe Glu Lys Thr Arg Leu Leu Cys Gly Ala Thr Leu  
 15 20 25 30  
 atc gcc ccc aga tgg ctc ctg aca gca gcc cac tgc ctc aag ccg tgg gtg 254  
 Ile Ala Pro Arg Trp Leu Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Lys Pro Trp Val  
 35 40 45  
 tca ctc acc tct ccc acc cat gtc tcc ccc gac ctt tcc tcc tcc aac tac 305  
 Ser Leu Thr Ser Pro Thr His Val Ser Pro Asp Leu Ser Ser Ser Asn Tyr  
 50 55 60  
 tgt ctc tcc cac ctc agc cgc tac ata gtt cac ctg ggg cag cac aac ctc 356  
 Cys Leu Ser His Leu Ser Arg Tyr Ile Val His Leu Gly Gln His Asn Leu  
 65 70 75 80  
 cag aag gag gag ggc tgt gag cag acc cgg aca gcc act gag tcc ttc ccc 407  
 Gln Lys Glu Glu Gly Cys Glu Gln Thr Arg Thr Ala Thr Glu Ser Phe Pro  
 85 90 95  
 cac ccc ggc ttc aac aac agc ctc ccc aac aaa gac cac cgc aat gac atc 458  
 His Pro Gly Phe Asn Asn Ser Leu Pro Asn Lys Asp His Arg Asn Asp Ile  
 100 105 110 115  
 atg ctg gtg aag atg gca tgc cca gtc tcc atc acc tgg gct gtg cga ccc 509  
 Met Leu Val Lys Met Ala Ser Pro Val Ser Ile Thr Trp Ala Val Arg Pro  
 120 125 130  
 ctc acc ctc tcc tca cgc tgy gtc act gct ggc acc agc tgc ctc att tcc 560  
 Leu Thr Leu Ser Ser Arg Cys Val Thr Ala Gly Thr Ser Cys Leu Ile Ser

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

135	140	145	
ggc tgg ggc agc acg tcc agc ccc cag tta cgc ctg cct cac acc ttg cga	611		
Gly Trp Gly Ser Thr Ser Ser Pro Gln Leu Arg Leu Pro His Thr Leu Arg			
150	155	160	165
tgc gcc aac atc acc atc att gag cac cag aag tgt gag aac gcc tac ccc	662		
Cys Ala Asn Ile Thr Ile Ile Glu His Gln Lys Cys Glu Asn Ala Tyr Pro			
170	175	180	
ggc aac atc aca gac acc atg gtg tgt gcc agc gtg cag gaa ggg ggc aag	713		
Gly Asn Ile Thr Asp Thr Met Val Cys Ala Ser Val Gln Glu Gly Gly Lys			
185	190	195	200
gac tcc tgc cag ggt gac tcc ggg ggc cct ctg gtc tgt aac cag tct ctt	764		
Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asn Gln Ser Leu			
205	210	215	
caa ggc att atc tcc tgg ggc cag gat ccg tgt gcg atc acc cga aag cct	815		
Gln Gly Ile Ile Ser Trp Gly Gln Asp Pro Cys Ala Ile Thr Arg Lys Pro			
220	225	230	
ggt gtc tac acg aaa gtc tgc aaa tat gtg gac tgg atc cag gag acg atg	866		
Gly Val Tyr Thr Lys Val Cys Lys Tyr Val Asp Trp Ile Gln Glu Thr Met			
235	240	245	250
aag aac aat tagactggac ccacccacca cageccatca ccctccattt ccacttgggtg	925		
Lys Asn Asn			

tttggttcc	934
-----------	-----

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 275

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; human

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



11.

&lt;400&gt; 6

```

Met Arg Ile Leu Gln Leu Ile Leu Leu Ala Leu Ala Thr Gly Leu Val Gly
    -20              -15              -10              -5
Gly Glu Thr Arg Ile Ile Lys Gly Phe Glu Cys Lys Pro His Ser Gln Pro
          -1   1              5              10
Trp Gln Ala Ala Leu Phe Glu Lys Thr Arg Leu Leu Cys Gly Ala Thr Leu
    15              20              25              30
Ile Ala Pro Arg Trp Leu Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Lys Pro Trp Val
          35              40              45
Ser Leu Thr Ser Pro Thr His Val Ser Pro Asp Leu Ser Ser Ser Asn Tyr
    50              55              60
Cys Leu Ser His Leu Ser Arg Tyr Ile Val His Leu Gly Gln His Asn Leu
    65              70              75              80
Gln Lys Glu Glu Gly Cys Glu Gln Thr Arg Thr Ala Thr Glu Ser Phe Pro
          85              90              95
His Pro Gly Phe Asn Asn Ser Leu Pro Asn Lys Asp His Arg Asn Asp Ile
    100              105              110              115
Met Leu Val Lys Met Ala Ser Pro Val Ser Ile Thr Trp Ala Val Arg Pro
          120              125              130
Leu Thr Leu Ser Ser Arg Cys Val Thr Ala Gly Thr Ser Cys Leu Ile Ser
    135              140              145
Gly Trp Gly Ser Thr Ser Ser Pro Gln Leu Arg Leu Pro His Thr Leu Arg
    150              155              160              165
Cys Ala Asn Ile Thr Ile Ile Glu His Gln Lys Cys Glu Asn Ala Tyr Pro
          170              175              180
Gly Asn Ile Thr Asp Thr Met Val Cys Ala Ser Val Gln Glu Gly Gly Lys
    185              190              195              200
Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asn Gln Ser Leu
          205              210              215

```

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Gln Gly Ile Ile Ser Trp Gly Gln Asp Pro Cys Ala Ile Thr Arg Lys Pro

220

225

230

Gly Val Tyr Thr Lys Val Cys Lys Tyr Val Asp Trp Ile Gln Glu Thr Met

235

240

245

250

Lys Asn Asn

<210> 7

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide to construct plasmid pSecTrypHis

<400> 7

aagcttggct agcaacacca tgaatctact cctgatacctt acctttgttg ctgctgctgt 60  
tgctgcccc tttgacgacg atgacaagga tccgaattc 99

<210> 8

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide to construct plasmid pSecTrypHis

<400> 8

gaattcggat ccttgatcat gtcgtcaaag ggggcagcaa cagcagcagc aacaaaggta 60  
aggatcagga gtagattcat ggtgttgcta gccaaagctt 99

<210> 9

<211> 15

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify neurosin-encoding sequence

<400> 9

ttggtgcatg gcgga

15

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify neurosin-encoding sequence

<400> 10

tcctcgagac ttggcctgaa tggtttt

27

<210> 11

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pSecTrypHis/Neurosin

<400> 11

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

14.

gcgctagcag atctccatga atctactcct gatcc

35

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid  
pSecTrypHis/Neurosin

&lt;400&gt; 12

tgaagcttgc catggaccaa cttgtcatc

29

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid  
pTrypHis

&lt;400&gt; 13

ccaagcttca ccatcaccat caccat

26

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



15.

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid  
pTrypSigTag

<400> 14

gcacagtcga ggctgat

17

<210> 15

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid  
pFBTrypSigTag

<400> 15

caaatgtggt atggctg

17

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify active hBSSP6-encoding  
sequence

<400> 16

atcatcaagg gttatgagtg

20

<210> 17

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify active hBSSP6-encoding sequence

<400> 17

cggaattcgc attaagaaga ggttggag

28

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6F1 for RACE for human BSSP6 (forward)

<400> 18

tcaagccccg ctacatagtt

20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6F2 for RACE for human BSSP6 (forward)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

17.

&lt;400&gt; 19

atcatgctgg tgaagatggc

20

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6F3 to amplify full-length human brain BSSP6-encoding mRNA (forward)

&lt;400&gt; 20

ggactcaaga gaggaacctg

20

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6F4 to amplify mature human BSSP6-encoding region (forward)

&lt;400&gt; 21

atcatcaagg ggttcgagtg

20

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6F5 to amplify full-length human prostate BSSP6-encoding mRNA (forward)

<400> 22

ctgccttgct ccacacctgg

20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6R1 for RACE for human BSSP6 (reverse)

<400> 23

ttctcacact tctggtgctc

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6R2 for RACE for human BSSP6 (reverse)

<400> 24

atgggtgtctg tgatgttgcc

20

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



<210> 25

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6R3/P to  
amplify full-length human BSSP6-encoding mRNA (reverse)

<400> 25

aactgcagga accaaacacc aagtgg

26

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP6F1 for RACE  
for mouse BSSP6 (forward)

<400> 26

cgacttcaac aacagcctcc

20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP6F2 for RACE  
for mouse BSSP6 (forward)

**THIS PAGE BLANK (USE)**

<400> 27

cttctttacc cgagctgtgc

20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP6F3 to amplify full-length mouse prostate BSSP6-encoding mRNA (forward)

<400> 28

taagctagga gaactgaggc

20

<210> 29

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP6F4 to amplify mature mouse BSSP6-encoding region (forward)

<400> 29

atcaagggtt atgagtgc

18

<210> 30

<211> 19

<212> DNA

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP6F5 to amplify full-length mouse brain BSSP6-encoding mRNA (forward)

<400> 30

cttacaggct tggggattg

19

<210> 31

<211>

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> 20

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP6R1 for RACE for mouse BSSP6 (reverse)

<400> 31

gatgatgcct tgaagagatc

20

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP6R2 for RACE for mouse BSSP6 (reverse)

<400> 32

catggtgtct gtgatgttc c

21

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<210> 33

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP6R3/E to amplify full-length mouse BSSP6-encoding mRNA (reverse)

<400> 33

cggaattcgc attaagaaga ggttggag

28

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6R3 to amplify a portion of BSSP6 variant type-encoding mRNA from human prostatic cancer cell line PC-3 (reverse)

<400> 34

atggtgtctg tgatgttgcc

20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

THIS PAGE BLANK (USPTO)



<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6F7 to amplify a portion of human BSSP6-encoding mRNA (forward)

<400> 35

cctcaagccg tgggtgtcac

20

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify conserved region of serin proteases-encoding sequence

<220>

<221> UNSURE

<222> 9, 12

<223> n is a, c, g or t.

<400> 36

gtgetcacng cngcbcaytg

20

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify conserved region of serin proteases-encoding sequence

<220>

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<221> UNSURE

<222> 12, 15

<223> n is a, c, g or t.

<400> 37

ccvctrwsdc cncnnggcga

20

<210> 38

<211> 117

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide to construct plasmid pTrypHis

<400> 38

AAGCTTGGCT AGCAACACCA TGAATCTACT CCTGATCCTT ACCTTTGTTG CTGCTGCTGT 60  
TGCTGCCCCC TTTCACCATC ACCATCACCA TGACGACGAT GACAAGGATC CGAATTC 117

<210> 39

<211> 117

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide to construct plasmid pTrypHis

<400> 39

GAATTCGGAT CCTTGTCATC GTCGTCATGG TGATGGTGAT GGTGAAAGGG GGCAGCAACA 60  
GCAGCAGCAA CAAAGGTAAG GATCAGGAGT AGATTCATGG TGTTGCTAGC CAAGCTT 117

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06476

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, 9/64, 5/06, 1/21, C07K16/40,  
C12P21/08, A01K67/027, G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00-15/90, C12N9/00-9/99

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GENBANK/EMBL/DDBJ/GENESEQ  
SWISSPROT/PIR/GENESEQ  
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Biochimica et Biophysica Acta, 1399, Aug. 20, 1998 Shigetaka Yoshida et al., "cDNA cloning and expression of a novel serine protease, TLSP", p. 225-228	1-12, 17, 18, 20-23, 25-36 13-16, 19, 24, 37 -41
X A	WO, 98/32865, A1 (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.), 30 July, 1998 (30.07.98), Full text; Figs. 1 to 5 & AU, 9860419, A & US, 5840871, A	1-12, 17, 18, 20-23, 25-37, 39 13-16, 19, 24, 38 , 40, 41
P, X P, A	WO, 99/49055, A1 (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.), 30 September, 1999 (30.09.99), Full text; Figs. 1 to 3 (Family: none)	1-12, 17, 18, 20-23, 25-36 13-16, 19, 24, 37 -41
P, X P, A	WO, 98/54963, A2 (HUMAN GENOME SCI. INC.), 10 December, 1998 (10.12.98), p. 145-146, 441-442 & AU, 9878120, A	1-12, 17, 18, 20-23, 25-36 13-16, 19, 24, 37 -41

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing  
date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means  
"P" document published prior to the international filing date but later  
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or  
priority date and not in conflict with the application but cited to  
understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such  
combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
15 February, 2000 (15.02.00)

Date of mailing of the international search report  
07 March, 2000 (07.03.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06476

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO, 99/31236, A2 (GENSET.), 24 January, 1999 (24.01.99), p.412-413	1-12, 17, 18, 20-23, 25-36
P, A	& AU, 9915030, A	13-16, 19, 24, 37 -41
A	The Journal of Neuroscience, 15(7), July 1995 Zu-lin Chen et al., "Expression and activity-dependent changes of a novel limbic-serine protease gene in the hippocampus", p.5088-5097	1-41
A	Gene, 213, June 15, 1998 Shigetaka Yoshida et al., "Sequence analysis and expression of human neuropsin cDNA and gene", p.9-16	1-41

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/06476

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/12, 9/64, 5/06, 1/21, C07K16/40,  
C12P21/08, A01K67/027, G01N33/543

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/00-15/90, C12N9/00-9/99

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GENBANK/EMBL/DBJ/GENESEQ  
SWISSPROT/PIR/GENESEQ  
BIOSIS (DIALOG)、WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	Biochimica et Biophysica Acta, 1399, Aug. 20, 1998 Shigetaka Yoshida et al., "cDNA cloning and expression of a novel serine protease, TLSP", p. 225-228	1-12, 17, 18, 20-23, 25-36 13-16, 19, 24, 37-41
X A	WO, 98/32865, A1 (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.) 30. 7月. 1998 (30. 07. 98) 全文, 第1-5図 & AU, 9860419, A & US, 5840871, A	1-12, 17, 18, 20-23, 25-37, 39 13-16, 19, 24, 38, 40, 41

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15. 02. 00

国際調査報告の発送日

07.03.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生

印

4B

9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO, 99/49055, A1 (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.)	1-12, 17, 18,
P, A	30. 9月. 1999 (30. 09. 99) 全文, 第1-3図 (ファミリーなし)	20-23, 25-36 13-16, 19, 24, 37-41
P, X	WO, 98/54963, A2 (HUMAN GENOME SCI. INC.)	1-12, 17, 18,
P, A	10. 12月. 1998 (10. 12. 98) p. 145-146, 441-442 &AU, 9878120, A	20-23, 25-36 13-16, 19, 24, 37-41
P, X	WO, 99/31236, A2 (GENSET.)	1-12, 17, 18,
P, A	24. 1月. 1999 (24. 01. 99) p. 412-413 &AU, 9915030, A	20-23, 25-36 13-16, 19, 24, 37-41
A	The Journal of Neuroscience, 15(7), July 1995 Zu-lin Chen et al., "Expression and activity-dependent changes of a novel limbic-serine protease gene in the hippocampus", p. 5088-5097	1-41
A	Gene, 213, June 15, 1998 Shigetaka Yoshida et al., "Sequence analysis and expression of human neuropsin cDNA and gene", p. 9-16	1-41



PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局  
特許協定条約に基づいて公開された国際出願

<b>(51) 国際特許分類7</b> C12N 15/12, 9/64, 5/06, 1/21, C07K 16/40, C12P 21/08, A01K 67/027, G01N 33/543	A1	<b>(11) 国際公開番号</b> WO00/31257  <b>(43) 国際公開日</b> 2000年6月2日 (02.06.00)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP99/06476  <b>(22) 国際出願日</b> 1999年11月19日 (19.11.99)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平10/347802 1998年11月20日 (20.11.98) JP  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 扶桑薬品工業株式会社 (FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP] 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号 Osaka, (JP) <b>(72) 発明者; および</b> <b>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)</b> 植村英俊 (UEMURA, Hidetoshi) [JP/JP] 〒664-0883 兵庫県伊丹市南鈴原3丁目133 Hyogo, (JP) 奥井 文 (OKUI, Akira) [JP/JP] 〒639-1123 奈良県大和郡山市筒井町569-1 コーポ睦603号 Nara, (JP) 小南勝也 (KOMINAMI, Katsuya) [JP/JP] 〒599-0212 大阪府阪南市自然田786-2 Osaka, (JP) 山口 希 (YAMAGUCHI, Nozomi) [JP/JP] 〒603-8146 京都府京都市北区鞍馬口通り寺町西入ル 新御霊口町285-79 Kyoto, (JP)	<b>(74) 代理人</b> 青山 葆, 外 (AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)  <b>(81) 指定国</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)  添付公開書類 国際調査報告書	
<b>(54) Title: NOVEL SERINE PROTEASE BSSP6</b>  <b>(54) 発明の名称</b> 新規セリンプロテアーゼBSSP6  <b>(57) Abstract</b> Proteins having the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 2, 4 and 6 and proteins derived from these proteins by deletion, substitution or addition of one or several amino acids in these amino acid sequences; base sequences encoding these proteins; a transgenic non-human animal having an altered BSSP6 expression level; an antibody against BSSP6; and a method for detecting BSSP6 in a specimen by using this antibody.		

(57)要約

配列番号2、4および6に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、または、これらのアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸からなるタンパク質、これらをコードする塩基配列を提供する。さらに、BSSP6の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物、BSSP6に対する抗体、該抗体を用いる検体中のBSSP6の検出方法を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LJ	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア	UA	ウクライナ
CA	カナダ	HU	ハンガリー		共和国	TM	トルクメニスタン
CF	中央アフリカ	ID	インドネシア	ML	マリ	TR	トルコ
CG	コンゴ	IE	アイルランド	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	IL	イスラエル	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IN	インド	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IS	アイスランド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IT	イタリア	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	JP	日本	NL	オランダ	YC	ユーゴスラビア
CU	キューバ	KE	ケニア	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KP	北朝鮮	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェッコ	KR	韓国	PL	ポーランド		
DE	ドイツ			PT	ポルトガル		
DK	デンマーク			RO	ルーマニア		

## 明 細 書

## 新規セリンプロテアーゼ B S S P 6

## 5 発明の分野

本発明は単離されたヒトおよびマウスのセリンプロテアーゼ（本明細書において各々「h B S S P 6」および「m B S S P 6」と称し、両者を区別しない場合は単に「B S S P 6」とする。）ポリヌクレオチド、それらの相同体、成熟体、前駆体、変異体および多形性変種ならびにそれらの検出方法に関する。さらには、  
10 h B S S P 6およびm B S S P 6タンパク質ならびにh B S S P 6およびm B S S P 6ポリヌクレオチドおよびタンパク質を含む組成物、それらの製造方法および使用に関する。

## 従来の技術

15 プロテアーゼは、一般に不活性前駆体として生合成され、分子内で限定加水分解を受け活性型プロテアーゼへ変換される。プロテアーゼである限りペプチド結合を加水分解する作用を有するが、種類によってその作用様式は極めて異なる。プロテアーゼはその触媒基の種類により、セリンプロテアーゼおよびシステイン  
20 プロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、金属プロテアーゼに分類される。各種のプロテアーゼは消化性を有するものから、様々な調節ドメインを持ち基質特異性が厳密で固有のタンパク質のみを特異的に加水分解するものまで、それらの性質は多彩である。

翻訳後のタンパク質に対しても様々なプロセッシングが行われ、活性型タンパク質が作られる。多くの分泌タンパクは、まず、活性型タンパク質のN末端に通常15～60個程度のアミノ酸残基から成る分泌に  
25 関与するペプチド（分泌シグナル）を付けた不活性前駆体型（プロ体）として細胞質内のリボソーム上で合成される。このペプチド部分は細胞膜を通過する機構に関連しており、ほとんどの場合、膜を通過する際に特異的なプロテアーゼで切断・除去され、成熟型タンパク質となる。分泌シグナルは中央部に疎水性アミノ酸から成る広い疎水性領域を

持ち、N末端近くには塩基性アミノ酸残基を有している。分泌シグナルはシグナルペプチドと同義語である。また、ある種のタンパク質は不活性前駆体のN末端にさらに分泌シグナルが結合しているものも存在し、この様なタンパク質をプレプロタンパク質（プレプロ体）という。

- 5       例えば、トリプシンはアミノ酸に翻訳された直後はプレプロ体として存在し、細胞外に分泌された後はプロ体として存在し、十二指腸でエンテロペプチダーゼもしくはトリプシン自体により限定加水分解されて活性型トリプシンとなる。

10       セリンプロテアーゼの至適pHは、中性から弱アルカリ性で、分子量は一般に30,000以下の場合が多い。分子量の大きい血液凝固・線溶・補体系プロテアーゼは、すべてトリプシン様セリンプロテアーゼに属しており、これらは多くの調節ドメインを持ち、生体反応において極めて重要なプロテアーゼカスケードを形成している。

15       最近、セリンプロテアーゼのコンセンサス配列に対するオリゴヌクレオチドプライマーを用いたPCRにより多くの新規プロテアーゼのcDNAおよびアミノ酸配列が決定されている。この方法により、Yamamuraら (Yamamura, Y. et al. ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 239, 386, 1997) 、Gschwendら (Gschwend, T. P. et al. ; Mol. Cell. Neurosci., 9, 207, 1997) 、Chenら (Chen, Z-L. et al. ; J. Neurosci., 15, 5088, 1995) およびその他の多数の研究者が新規セリンプロテアーゼを発見している。

20       特開平9-149790号の配列番号3には新規セリンプロテアーゼニューロシン (Neurosin) が開示されており、またニューロシンはBiochimica et Biophysica Acta, 1350, 11-14, 1997にも報告されている。これによりセリンプロテアーゼ遺伝子を用いてニューロシンを大量に生産する方法および該酵素を用いる特異的阻害物質のスクリーニング方法が提供される。また、当該スクリーニング方法は、各種疾患治療剤の探索に有用であることも示されている。

25       ニューロシンのように脳・神経系で発現されるセリンプロテアーゼは脳・神経系において種々の役割を果たしていると考えられる。従って、脳・神経系において発現されている新規プロテアーゼをコードする遺伝子の単離およびこの遺伝子を使用したタンパク質の生産は、脳・神経系に関連する各種疾患の診断および治

療に有用である可能性がある。例えば、脳においてはアルツハイマー病（AD）、てんかん、脳腫瘍等の脳疾患の治療および診断に利用できる可能性がある。

ADの臨床診断は今日、DSM-III-RおよびNINCDS-ADRDAの診断基準（McKhann, G. et al. ; Neurology, 34, 939, 1994）または、DSM-IVの診断基準（American Psychiatric Association ; Diagnostic and statistical manuals of mental disorders, 4th ed, Washington DC, American Psychiatric Association, 1994）に基づいて一般的に行われている。しかし、これらの診断基準は、日常生活や社会生活上重大な支障を引き起こすほどの認知機能の低下を条件としているため、患者一人一人の社会生活のレベル、さらに診断に当たる医師の専門性、経験にも左右され得るものであり、科学的客観性に乏しいことが指摘されている。また、アルツハイマー病の確定診断は、病理組織学的検索によりなされるわけであるが、臨床診断と剖検診断との不一致も少なからず指摘されている。

現在、アルツハイマー病の臨床診断では補助的手段として画像診断も用いられるようになり、PETやSPECTにより海馬、大脳皮質の頭頂葉等の特異的な部位においてアルツハイマー病に特異的な代謝の低下、萎縮を初めとする脳機能の検査が可能となった。しかしながら、頭頂葉から側頭葉にかけての血流低下によりアルツハイマー病を確定するのは極めて危険である。また、MRS検査では、アルツハイマー病を含む痴呆患者に関して有用である報告は殆どない。さらに、CT・MRI画像診断も用いられているが、脳の萎縮やPVL等の白質病巣はアルツハイマー型痴呆に特異的ではなく、脳萎縮は年齢と共に進行することが報告されており、必ずしもアルツハイマー型痴呆に対して前記所見が見られるとは限らない。また、MRIは磁場強度や装置の性能または撮影条件により得られる画質が異なるため、異なる施設間で数値的比較ができるのは萎縮性変化のみである。また、血管性痴呆でも脳室拡大を認め得るし、脳底動脈領域の虚血後に海馬の萎縮を認める症例も存在する。

生物学的診断マーカーの開発は、この様な経緯の中からADの臨床診断に、より正確的な客観性を与えるものとして多くの研究者から求められてきたと同時に、1) AD治療薬の客観的な効果判定システム、2) ADの診断基準を満たす以前

の、あるいは発症前のADの検出という将来的に重要な役割が期待されている。さらに、同一の診断マーカーを用いることにより、異なる施設間の比較研究も可能となる。したがって、生物学的診断マーカーの開発は、多くのAD研究領域の中でも、最も重要な領域として認識され、将来への展望が期待されている。現在までに行われてきた診断マーカー開発へのアプローチは、ADを特徴付ける病理学的変化である老人斑や神経原線維変化の構成成分からのアプローチと、それ以外の物からのアプローチに大別される。前者として脳脊髄液タウタンパク質、A $\beta$ およびその前駆体タンパク質である $\beta$ APP、後者として抗コリン剤による瞳孔散大試験、Apo Eおよび他のAD関連遺伝子があるが良好な結果は得られていない。

セリンプロテアーゼは、癌細胞においても重要な役割を担っていると考えられる。癌を外科的にあるいは局所的放射線照射で根絶することが困難である理由は、癌に転移能力があるからである。固形腫瘍細胞が体内に広がるには、本来隣接していた細胞との接着をゆるめて、本来の組織から離れ、他の組織の中を通り血管もしくはリンパ管に到達し、基底層と管の内皮層を抜けて循環系に入り、体のどこかで循環系から出て、新しい環境中で生存し、増殖しなければならない。各種癌腫での隣接する上皮細胞との接着性は、上皮の細胞間接着分子であるカドヘリンが発現されなくなると失われるが、組織の突破は細胞外マトリックスを分解するタンパク分解酵素に依存すると考えられている。

マトリックスを分解する酵素として主に金属プロテアーゼ (Rha, S. Y. et al. ; Breast Cancer Research Treatment, 43, 175, 1997) とセリンプロテアーゼがある。これらは共同してコラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンのようなマトリックスタンパク質を分解する。特に今まで知られているセリンプロテアーゼの中でマトリックスの分解に関与するものとして、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (U-PA) がある。U-PAはタンパク分解連鎖反応に特異的な引き金の役割を持つ。その直接の標的はプラスミノゲンで、これは血中に豊富に存在し、傷や腫瘍および炎症部位などの組織の再構築部位に蓄積する不活性なセリンプロテアーゼの前駆体である。その他に、癌の転移・浸潤に関与しているプロテアーゼとして組織因子、ライソゾーム系の加水分解酵素および

コラゲナーゼ等が知られている。

現在我が国の死因の第一位を占める癌で、年間20万人以上が死亡している。ゆえに、癌の診断および治療もしくは予防の目印となる特異物質の研究が精力的に行われている。この特異物質を腫瘍マーカーもしくは腫瘍マーカー関連バイオマーカーと名付けている。これらは癌の治療前診断補助、発生臓器および病理組織型の推定、治療効果のモニタリング、再発の早期発見や予後の予測等に利用され、現在では腫瘍マーカーを用いる検査は臨床に不可欠の検査となっており、中でも肝細胞癌やヨークサック腫瘍に特異性が高いアルファ胎児タンパク (AFP) (Taketa, K. et al. ; Tumour Biol., 9, 110, 1988) および癌胎児性タンパク抗原 (CEA) は世界中で広く利用されている。将来、腫瘍マーカーの必要性は益々高まり、信頼性の高い癌の血清学的診断法に有用な臓器特異的マーカー、腫瘍細胞種特異的マーカー等の開発が期待されている。現在までにヒト前立腺上皮細胞で発現しているセリンプロテアーゼであるヒト腺性カリクレイン (hK2) は前立腺癌のマーカーとして有用であることが報告されている。また、hK2は前立腺特異的抗原 (PSA) の配列と78%の相同性を有しており、PSAも前立腺癌の生化学的マーカーとして広く使用されている (Mikolajczyk, S. D. et al. ; Prostate, 34, 44, 1998、Pannek, J. et al. ; Oncology, 11, 1273, 1997、Chu, T. M. et al. ; Tumour Biology, 18, 123, 1997、Hsieh, M. et al. ; Cancer Res., 57, 2651, 1997)。さらに、hK2は前立腺癌のマーカーだけでなく、胃癌のマーカーとしても有用であることが報告されている (Cho, J. Y. et al. ; Cancer, 79, 878, 1997)。その他、血清中サイトケラチン19フラグメントを測定するシフラ (CYFRA 21-1) は肺癌に有用であること (Sugiyama, Y. et al. ; Japan J. Cancer Res., 85, 1178, 1994)、ガストリン放出ペプチド前駆体 (ProGRP) が肺小細胞癌に対して有用な腫瘍マーカーであること (Yamaguchi, K. et al. ; Japan, J. Cancer Res., 86, 698, 1995) が報告されている。

#### 発明の目的

ゆえに、本発明の主な目的は、脳の各部位、髄質、前立腺、精巣、粘膜腺、胎

盤、心臓および肺等の各種組織において、アルツハイマー病（AD）、てんかん、癌、炎症、不妊症、前立腺肥大症をはじめとする各種疾患の治療および診断に利用できる可能性があり、さらに、現在用いられている診断マーカーに取って代わる、優れたマーカーとなり得る新規セリンプロテアーゼを提供することである。

#### 5 発明の要旨

この様な状況の下、我々はマウスおよびヒトの新規セリンプロテアーゼのクローニングに成功した。ヒト新規セリンプロテアーゼ（hBSSP6）の成熟型はアミノ酸229個から成り、前立腺型はアミノ酸282個（配列番号2、アミノ酸番号53～229）からなり、脳型は250個（配列番号2、21～229）からなることを証明した。また、胎盤型はさらに上流のメチオニンから開始するより大型のタンパク質であると考えられる。さらに、hBSSP6の変異型（以下、変異型hBSSP6）の成熟型はアミノ酸254個（配列番号6、アミノ酸番号1～254）からなることを証明した。マウス新規セリンプロテアーゼ（mBSSP6）の成熟型はアミノ酸229個（配列番号4、アミノ酸番号1～229）から成り、脳型はアミノ酸249個（配列番号4、アミノ酸番号20～229）から成り、前立腺型はアミノ酸276個（配列番号4、アミノ酸番号47～229）から成ることを証明した。また、成熟型のセリンプロテアーゼのアミノ酸配列中には、セリンプロテアーゼの活性を有するコンセンサス配列が含まれている。

本発明を概説すれば、本発明の第1の態様は生物学的に活性な、成熟体セリンプロテアーゼhBSSP6およびmBSSP6アミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列である。

すなわち、配列番号2（アミノ酸番号1～229）に示すアミノ酸229個から成るアミノ酸配列（成熟型hBSSP6（配列番号2））および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号1、塩基番号272～958）である。さらに、配列番号6（アミノ酸番号1～254）に示すアミノ酸254個から成るアミノ酸配列（変異型hBSSP6（配列番号6））および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号5、塩基番号114～875）である。また、実質的



に配列番号 2 および 6 に類似するアミノ酸配列および実質的に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。あるアミノ酸配列に実質的に類似するアミノ酸配列とは、各アミノ酸配列を有するタンパク質が同等の性質を有する範囲内で該アミノ酸配列に 1 もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、付加および／または挿入等の修飾を施したアミノ酸配列をいう。タンパク質の修飾体には、例えば、リン酸付加体、糖鎖付加体、金属付加体（例えばカルシウム付加体）、他のタンパク質、例えばアルブミン等との融合体、またはタンパク質の二量体等が含まれる。

さらに、配列番号 4（アミノ酸番号 1～229）に示すアミノ酸 229 個から成るアミノ酸配列（成熟型 mBSSP6（配列番号 4））および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号 3、塩基番号 244～930）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

本発明の第 2 の態様は、成熟型 hBSSP6 アミノ酸配列（配列番号 2）の N 末端側に、配列番号 2 に示す -53 から -1 までの 53 個のアミノ酸が付加された、アミノ酸 282 個から成るアミノ酸配列（前立腺型 hBSSP6（配列番号 2、アミノ酸番号 -53～229））および該アミノ酸をコードする塩基配列（配列番号 1、塩基番号 113～958）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

本発明の第 3 の態様は、成熟型 hBSSP6 アミノ酸配列（配列番号 2）の N 末端側に、配列番号 2 に示す -21 から -1 までの 21 個のアミノ酸が付加された、アミノ酸 250 個から成るアミノ酸配列（脳型 hBSSP6（配列番号 2、アミノ酸番号 -21～229））および該アミノ酸をコードする塩基配列（配列番号 1、塩基番号 209～958）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

本発明の第 4 の態様は、成熟型 mBSSP6 アミノ酸配列（配列番号 4）の N

末端側に、配列番号4に示す-20から-1までの20個のアミノ酸が付加された、アミノ酸249個から成るアミノ酸配列（脳型mBSSP6（配列番号4、アミノ酸番号-20～229））および該アミノ酸をコードする塩基配列（配列番号3、塩基番号184～930）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

本発明の第5の態様は、成熟型mBSSP6アミノ酸配列（配列番号4）のN末端側に、配列番号4に示す-47から-1までの47個のアミノ酸が付加された、アミノ酸276個から成るアミノ酸配列（前立腺型mBSSP6（配列番号4、アミノ酸番号-47～229））および該アミノ酸をコードする塩基配列（配列番号3、塩基番号103～930）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

本発明の第6の態様は、変異型hBSSP6の成熟型アミノ酸配列（配列番号6のアミノ酸1～254）のN末端に、配列番号6に示す-21～-1までの21個のアミノ酸が付加された、アミノ酸275個からなるアミノ酸配列（変異型hBSSP6（配列番号6、アミノ酸番号-21～254））および該アミノ酸をコードする塩基配列（配列番号5、塩基番号51～875）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

本発明の第7の態様は、第1～第6の態様の塩基配列を含むベクター、これにより形質転換された形質転換細胞である。

本発明の第8の態様は、第7の態様の形質転換細胞からBSSP6タンパク質を製造する方法である。

本発明の第9の態様は、BSSP6遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物である。

本発明の第10の態様は、BSSP6タンパク質またはその断片に対する抗体およびその製造方法である。

本発明の第 1 1 の態様は、第 9 の態様の抗体を用いる検体中の B S S P 6 タンパク質またはその断片を測定する方法である。

本発明の第 1 2 の態様は、B S S P 6 タンパク質を含む疾患の診断マーカーである。

5       以下、本明細書において、特記しない限り、各配列番号が示す塩基配列には、上記に示した種々のその断片、類似する塩基配列またはこれらの断片を含み、各配列番号が示すアミノ酸配列には、上記に示した種々のその断片、類似するアミノ酸配列、またはこれらの断片、もしくはこれらの修飾体を含むものとする。また、本明細書において、特記しなき限り、B S S P 6、h B S S P 6（変異型 h  
10       B S S P 6 を含む）、m B S S P 6 には、上記に示した各アミノ酸配列を有するタンパク質を含むものとする。

#### 図面の簡単な説明

15       図 1 は、human multiple tissue blotを用いたノザンブロットの結果を示す図である。

図 2 は、human multiple tissue blot IIを用いたノザンブロットの結果を示す図である。

図 3 は、human brain multiple tissue blot IIを用いたノザンブロットの結果を示す図である。

20       図 4 は、human brain multiple tissue blot IVを用いたノザンブロットの結果を示す図である。

図 5 は、実施例 2 において調製した mRNA を用いたノザンブロットの結果を示す図である。

25       図 6 は、実施例 2 において調製した mRNA を用いたノザンブロットの結果を示す図である。

図 7 は、実施例 4 の方法により構築したプラスミドを示す図である。

図 8 は、実施例 4 の方法によるプラスミドの構築図を示す図である。

図 9 は、h B S S P 6 の基質特異性を示す図である。

図 1 0 は、抗ヒト B S S P 6 抗体を用いた組換え体 B S S P 6 の検出を示す図

である。

図 1 1 は、h B S S P 6 の R T - P C R の結果を示す図である。

図 1 2 は、大腸菌における変異型 h B S S P 6 の発現を示す図である。

図 1 3 は、変異型特異的 R T - P C R 産物に対して h B S S P 6 プローブを用  
5 いて行った P C R - サザンハイブリダイゼーションの結果を示す図である。

### 発明の詳細な説明

本明細書中で言うプロ部分とはプロ体から活性型タンパク質を削除した部分を  
言い、プレ部分とはプレプロ体からプロ体を削除した部分を言い、プレプロ部分  
10 とはプレプロ体から活性型タンパク質を削除した部分と言う。

配列番号 2 (アミノ酸番号 1 ~ 2 2 9) に示すアミノ酸配列はアミノ酸 2 2 9  
個から成る h B S S P 6 成熟型あるいは活性型タンパク質であり、それをコード  
する塩基配列は塩基数 6 8 7 個から成る。本発明者らは本発明の成熟型タンパク  
質のアミノ酸配列中の N 末端のアミノ酸 1 ~ 数個程度を欠失または付加させても  
15 セリンプロテアーゼ活性が保持されることを証明しているが、好ましくは本アミ  
ノ酸配列である。

配列番号 2 (アミノ酸番号 - 7 0 ~ 2 2 9) に示すアミノ酸配列はアミノ酸 2  
9 9 個から成る h B S S P 6 前立腺型タンパク質であり、それをコードする塩基  
配列は塩基数 8 9 7 個から成る。本発明者らは前立腺型タンパク質のアミノ酸配  
20 列中の N 末端のアミノ酸 1 ~ 数個程度を欠失させてもセリンプロテアーゼ活性が  
保持されることを証明しているが、好ましくは本アミノ酸配列である。アミノ酸  
番号 - 7 0 ~ - 1 はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、h B S S P 6 タンパ  
ク質の前駆体型と考えられる。

配列番号 2 (アミノ酸番号 - 2 1 ~ 2 2 9) に示すアミノ酸配列はアミノ酸 2  
5 0 個から成る h B S S P 6 脳型タンパク質であり、それをコードする塩基配列  
25 は塩基数 7 5 0 個から成る。本発明者らは脳型タンパク質のアミノ酸配列中の N  
末端のアミノ酸約 1 ~ 数個程度を欠失または付加させてもセリンプロテアーゼ活  
性が保持されることを証明しているが、好ましくは本アミノ酸配列である。アミ  
ノ酸番号 - 2 1 ~ - 1 はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、h B S S P 6 タ

ンパク質の前駆体型と考えられる。

配列番号4（アミノ酸番号1～229）に示すアミノ酸配列はアミノ酸229個から成るmBSSP6成熟型あるいは活性型タンパク質であり、それをコードする塩基配列は、塩基数687個から成る。本発明者らは成熟型タンパク質のアミノ酸配列中のN末端のアミノ酸1～数个程度を欠失させてもセリンプロテアーゼ活性が保持されることを証明しているが、好ましくは本アミノ酸配列である。

配列番号4（アミノ酸番号－20～229）に示すアミノ酸配列はアミノ酸249個から成るmBSSP6脳型タンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数747個から成る。本発明者らは脳型タンパク質のアミノ酸配列中のN末端のアミノ酸約1～数个程度を欠失または付加させてもセリンプロテアーゼ活性が保持されることを証明しているが、好ましくは本アミノ酸配列である。アミノ酸番号－20～－1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、mBSSP6タンパク質の前駆体型と考えられる。

配列番号4（アミノ酸番号－47～229）に示すアミノ酸配列はアミノ酸276個から成るmBSSP6前立腺型タンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数828個から成る。本発明者らは前立腺型タンパク質のアミノ酸配列中のN末端のアミノ酸約1～数个程度を欠失させてもセリンプロテアーゼ活性が保持されることを証明しているが、好ましくは本アミノ酸配列である。アミノ酸番号－47～－1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、mBSSP6タンパク質の前駆体型と考えられる。

配列番号6（アミノ酸番号1～254）に示すアミノ酸配列は、アミノ酸254個から成る変異型hBSSP6の成熟型あるいは活性型タンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数762個から成る。変異型hBSSP6とhBSSP6とのアミノ酸配列上での差異は、hBSSP6アミノ酸配列（配列番号2）は変異型hBSSP6アミノ酸配列（配列番号6）のアミノ酸番号46～70が除去された配列である。尚、変異型hBSSP6に言う変異型とはhBSSP6と単に区別するために使用するものである。

配列番号6（アミノ酸番号－21～254）に示すアミノ酸配列は、アミノ酸275個から成る変異型hBSSP6の前駆体タンパク質であり、それをコード

する塩基配列は塩基数 825 個から成る。アミノ酸番号 -21 ~ -1 はプレプロ部分あるいはプロ部分である。

5 本発明の hBSSP6 (変異型 hBSSP6 を含む、以下同じ) もしくは mBSSP6 をコードする塩基配列は、該タンパク質を発現している細胞から mRNA を調製して、常法により二本鎖 DNA に変換して得ることができる。mRNA の調製にはグアニジンイソチオシアネート・塩化カルシウム法 (Chirwin, et al., Biochemistry, 18, 5294, 1979) 等を用いることができる。全 RNA から  
10 のポリ (A) + RNA の調製はオリゴ (dT) を結合した担体、例えばセファロースあるいはラテックス粒子等を用いたアフィニティークロマトグラフィー等を用いて行うことができる。上記のごとくして得られた RNA を鋳型にして、3' 末端に存在するポリ (A) 鎖に相補的なオリゴ (dT) またはランダムプライマーあるいは hBSSP6 もしくは mBSSP6 のアミノ酸配列の一部に相応する合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして逆転写酵素で処理し、この様にして  
15 得られた mRNA に相補的な DNA もしくは cDNA から成るハイブリッドの mRNA 鎖を、例えばイー・コリ (E. coli) RNase H、イー・コリ DNA ポリメラーゼ 1、イー・コリ DNA リガーゼで処理し、DNA 鎖に変換することにより、二本鎖 cDNA を得ることができる。

hBSSP6 もしくは mBSSP6 遺伝子塩基配列をもとに合成したプライマーを用いて、hBSSP6 もしくは mBSSP6 発現細胞ポリ (A) + RNA を  
20 鋳型にして RT-PCR 法によりクローニングすることも可能である。また、PCR によらず、hBSSP6 もしくは mBSSP6 遺伝子塩基配列をもとにプローブを作製・合成し、直接 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、目的とする cDNA を得ることもできる。本発明の遺伝子を、これらの方法により得られた遺伝子の中から、その遺伝子の塩基配列を確認することにより選択することができる。本発明の遺伝子は、例えばホスホイミダイト法 (Mattencchi, M. D. et al., J. Am. Chem. Soc., 130, 3185, 1981) 等の核酸化学合成を用いる常法に従って製造することもできる。

25 上記のようにして得られた hBSSP6 または mBSSP6 遺伝子を用いて、各種組織におけるこれらの発現を調べることができる。

ノザン・ブロット解析の場合、h B S S P 6は脳の各部位、髄質、胎盤、肺、心臓、前立腺、精巣、粘膜腺等で発現が認められ、m B S S P 6は15日目の胎児脳、および生後3ヶ月のマウスの精巣および前立腺において発現が認められた。R T - P C R解析の場合においては、h B S S P 6は成体の海馬および前立腺で発現が認められ、m B S S P 6は新生児から生後12日までのマウスの脳、および生後4ヶ月のマウスの前立腺で発現が認められた。また、変異型h B S S P 6のm R N Aは前立腺癌細胞株であるP C 3、D U 1 4 5、L N C a Pに発現し、組織においては、精巣、肺、胎児脳、成人海馬で発現していた。ゆえに、脳、前立腺、髄質、肺、胎盤、心臓、精巣および粘膜腺において、本発明の新規セリンプロテアーゼが様々な役割を担っていると予想される。例えば、脳においてはアルツハイマー病（A D）、てんかん、脳腫瘍等の脳疾患の治療および診断に利用できる可能性があり、また、その他の組織においては癌、特に前立腺癌、炎症、不妊症、前立腺肥大症をはじめとする各種疾患の治療および診断に利用できる可能性がある。その他に血液凝固・線溶・補体系にも何らかの影響を及ぼしている

と予想できる。

なお、一般に真核生物の遺伝子は多形現象を示すことが多く、この現象によって1個あるいはそれ以上のアミノ酸が置換される場合もあり、また、その場合であってもタンパク質の活性が保持される場合もある。ゆえに、配列番号2、4または6のいずれかに示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子を人工的に改変したものをを用いて得られたタンパク質をコードする遺伝子は、該タンパク質が本発明の遺伝子の特徴的な機能を有する限り全て本発明に含まれる。さらに、配列番号2、4または6のいずれかに示されるアミノ酸配列を人工的に改変したタンパク質は、本発明のタンパク質の特徴を有する限り全て本発明に含有される。改変とは、置換、欠失、付加および／または挿入を含むと解する。特に、配列番号2もしくは4に示すh B S S P 6もしくはm B S S P 6成熟型タンパク質のN末端アミノ酸に数個のアミノ酸を付加あるいは欠失等の改変をさせても、活性が保持されることを本発明者らは証明している。

すなわち、本発明のタンパク質には配列番号2、4または6のいずれかに記載のアミノ酸配列、またはこれらのアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ

酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたアミノ酸配列を含み、セリンプロテアーゼファミリーに属するタンパク質が含まれる。

所望のアミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる

5 (Grantham, R. et al., Nucleic Acids Res., 9, r43, 1981)。従って、コドンの縮重を考慮して塩基配列を適宜改変したものもまた本発明の塩基配列に含まれる。さらに、これら塩基配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドから成るプライマーを利用した部位特異的変異導入法 (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81, 5662, 10 1984) 等に従って行うことができる。

さらに、配列番号 1、3 または 5 のいずれかに記載の塩基配列またはそれに相補的な塩基配列とハイブリダイズすることができ、かつその塩基配列によってコードされるタンパク質が本発明による h B S S P 6 もしくは m B S S P 6 と同等の性質を有する限り、その DNA は本発明による DNA に含有される。ストリン  
15 ジェントな条件下で特定配列にハイブリダイズすることができる配列は、特定配列がコードするタンパク質と類似した活性を持つものが多いと考えられる。本発明におけるストリンジェントな条件とは、例えば、5 × S S C、5 % デンハート溶液 (0. 1 % B S A、0. 1 % F i c o l l 4 0 0、0. 1 % P V P)、0. 5 % S D S および 2 0 μ g / m l 変性サケ精子 DNA を含有する溶液中で、3  
20 7 ° C にて一夜インキュベートし、ついで室温にて 0. 1 % S D S 含有 2 × S S C で洗浄する条件である。S S C の代わりに適宜 S S P E を使用してもよい。

配列番号 1、3 または 5 のいずれかに記載の塩基配列に基づいて、h B S S P 6 もしくは m B S S P 6 遺伝子を検出するためのプローブを設定することができる。あるいは、これらの塩基配列を含む DNA や RNA を増幅するためのプライ  
25 マーを設定することができる。与えられた配列をもとにプローブやプライマーを設定することは当業者が日常的に行っている。設定された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを化学合成によって得ることができる。そしてそのオリゴヌクレオチドに適当な標識を付加すれば、様々な形式のハイブリダイゼーションアッセイに利用することができる。あるいは P C R の様な核酸の合成反応に利用するこ



とができる。プライマーに利用するオリゴヌクレオチドは少なくとも10塩基、好適には15～50塩基の長さとするのが望ましく、プローブに利用するオリゴヌクレオチドは100塩基から全長の長さであることが望ましい。

さらに、本発明が提供するhBSSP6もしくはmBSSP6のcDNA塩基配列に基づいて、ゲノム中に存在するhBSSP6もしくはmBSSP6遺伝子のプロモーター領域、エンハンサー領域を取得することも可能である。具体的には特開平6-181767号、J. Immunol., 155, 2477, 1995、Proc. Natl. Acad. Sci, USA., 92, 3561, 1995) 等と同様の方法でこれらの制御領域の取得が可能である。本明細書中で言うプロモーター領域とは転写開始部位の上流に存在する遺伝子の発現を制御するDNA領域を、エンハンサー領域とはイントロン、5'非翻訳領域、または3'非翻訳領域に存在する遺伝子の発現を増強するDNA領域を言う。

本発明はまた、配列番号1に示す塩基配列もしくは配列番号2のアミノ酸配列をコードする塩基配列、配列番号3に示す塩基配列もしくは配列番号4のアミノ酸配列をコードする塩基配列、配列番号5に示す塩基配列もしくは配列番号6のアミノ酸配列をコードする塩基配列、あるいは、これらに類似する塩基配列を含むことを特徴とするベクターにも関する。ここで特定の塩基配列に類似する塩基配列とは、上記したストリンジェントな条件下で特定の塩基配列またはこれに相補的な塩基配列とハイブリダイズすることができ、かつその塩基配列によってコードされるタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列である。

ベクターは例えば、Invitrogen社製のpBAD/His、pRSETA、pcDNA2.1、pTrcHis2A、pYES2、pBlueBac4.5、pcDNA3.1、pSecTag2、Novagen社製のpET、pBAC、Promega社製のpGEM、Stratagene社製のpBluescriptIIもしくはPharmacia社製のpGEX、pUC18/19、pFastBAC1 (GIBCO社製) 等、本発明のタンパク質を発現し得るベクターであれば特に限定されないが、好ましくは、実施例記載のpCRII-TOPOベクター、および、商業的に入手し得る発現ベクター、例えばp

Sec Tag 2 Aベクター、pSec Tag 2 Bベクター（Invitrogen社）を用い、自体公知の方法で本発明のタンパク質の分泌に適した分泌シグナル核酸配列と、その3'下流側に、Tag核酸配列、切断可能核酸配列および本発明の成熟体または活性型タンパク質をコードする核酸配列を挿入することができるクローニング部位をこの順序に組み込んで構築したタンパク質発現ベクター（本願出願人による「タンパク質発現ベクターとその使用」についての同日付け特許出願明細書）を用いる。具体的には、分泌シグナルとして、トリプシンシグナル、Tag塩基配列としてポリヒスチジンをコードする塩基配列、切断可能塩基配列として、酵素特異的切断が可能なアミノ酸配列をコードする塩基配列である、アミノ酸配列Asp-Asp-Asp-Asp-Lysをコードする塩基配列（当該アミノ酸配列はエンテロカイネースにより認識され、そのC末端部分において、組換え融合タンパク質が切断される。）を用いることが好ましい。

さらに、本発明は上記したようなベクターによりこれらが保持する本発明の塩基配列を発現可能に保持する形質転換細胞を提供する。本明細書における形質転換細胞に用いる宿主細胞としては、好ましくは動物細胞および昆虫細胞であるが、本発明の発現ベクター中の目的タンパク質をコードする核酸配列を発現し、細胞外に分泌することが可能な全ての細胞（微生物を含む）が挙げられる。

本明細書における動物細胞もしくは昆虫細胞としては、それぞれヒト由来の細胞、ハエもしくはカイコ由来の細胞が挙げられる。例えば、CHO細胞、COS細胞、BHK細胞、Vero細胞、ミエローマ細胞、HEK 293細胞、HeLa細胞、Jurkat細胞、マウスL細胞、マウスC127細胞、マウスFM3A細胞、マウス繊維芽細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、S2、Sf9、Sf21、High Five<sup>TM</sup>（登録商標）細胞等がある。本明細書における微生物とは、大腸菌もしくは酵母等が含まれる。

本発明のタンパク質は、それ自体、単離・精製・認識しやすいように組換え融合タンパク質として発現させることができる。組換え融合タンパク質とは目的タンパク質をコードする核酸配列により発現されたタンパク質のN末端側または／およびC末端側に適当なペプチド鎖を付加して発現させたタンパク質である。本明細書における組換えタンパク質とは、目的タンパク質をコードする核酸配列を

本発明の発現ベクターに組み込み、発現された組換え融合タンパク質から目的タンパク質をコードする核酸由来でないアミノ酸配列を切断したものであり、実質的に本発明のタンパク質と同義語である。

上記発現ベクターの宿主細胞への導入法としては、例えば、リポポリアミン法、  
5 DEAEーデキストラン法、ハナハン法、リポフェクチン法、リン酸カルシウム法によるトランスフェクション、マイクロインジェクションおよびエレクトロポレーション等の方法がある。

本発明は、上記したような本発明の塩基配列で形質転換した細胞を培養し、産生されたhBSSP6またはmBSSP6を採取する、hBSSP6またはmB  
10 SSP6の製造法にも関する。細胞の培養、タンパク質の分離、精製も、自体公知の方法によって行うことができる。

本発明は、また、本発明の新規なセリンプロテアーゼの阻害剤にも関する。阻害剤のスクリーニングは、候補化合物と接触させた酵素の活性を、候補化合物と接触させていない酵素の活性と比較する等の自体公知の方法により行うことができる。  
15

本発明は、hBSSP6もしくはmBSSP6遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物に関する。ここで、hBSSP6もしくはmBSSP6遺伝子とは、hBSSP6もしくはmBSSP6をコードするcDNA、ゲノムDNAあるいは合成DNAを含む。また、遺伝子の発現には転写と翻訳の  
20 いずれのステップも含まれる。本発明によるトランスジェニック非ヒト動物は、hBSSP6もしくはmBSSP6の機能あるいは発現調節の研究、hBSSP6もしくはmBSSP6が関与すると予想される疾患のメカニズム解明、医薬品のスクリーニング・安全性試験に用いる疾患モデル動物の開発に有用である。

本発明においては、遺伝子の発現を正常に調節しているいくつかの重要な部位  
25 (エンハンサー、プロモーター、イントロン等)の一部に欠失、置換、付加および／または挿入などの変異を起こさせることにより、本来の遺伝子の発現レベルと比較して上昇または下降するように人工的に修飾することができる。この変異の導入は、公知の方法により行うことができ、トランスジェニック動物を得ることができる。

トランスジェニック動物とは狭義には遺伝子組換えにより、外来遺伝子が生殖細胞に人為的に導入された動物のことをいい、広義にはアンチセンスRNAを用いて特定の遺伝子の機能を抑えたアンチセンス・トランスジェニック動物や、胚性幹細胞（ES細胞）を用いて特定の遺伝子をノックアウトした動物、点突然変異DNAを導入した動物を含み、個体発生の初期に外来遺伝子が安定して染色体に導入され、その子孫に遺伝形質として伝達され得る動物のことをいう。

本明細書中でいうトランスジェニック動物とはヒト以外のすべての脊椎動物を含む広義の意味に解する。本発明におけるトランスジェニック動物は、hBSSP6もしくはmBSSP6の機能あるいは発現調節の研究、ヒトにおいて発現している細胞に関連する疾患のメカニズムの解明、医薬品のスクリーニング・安全性試験に用いる疾患モデル動物の開発に有用である。

トランスジェニック動物の作製方法は、位相差顕微鏡下で前核期卵子の核に、微小ピペットで遺伝子を直接導入する方法（マイクロインジェクション法、米国特許第4873191号）、胚性幹細胞（ES細胞）を使用する方法などがある。その他、レトロウィルスベクターまたはアデノウィルスベクターに遺伝子を挿入し、卵子に感染させる方法、また、精子を介して遺伝子を卵子に導入する精子ベクター法等が開発されている。

精子ベクター法とは、精子に外来遺伝子を付着またはエレクトロポレーション等の方法で精子細胞内に取り込ませた後に、卵子に受精させることにより、外来遺伝子を導入する遺伝子組換え法である（M. Lavitrano et al., Cell, 57, 717, 1989）。あるいはバクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼ系やサッカロマイセス・セレビシアエ（*Saccharomyces cerevisiae*）のFLPリコンビナーゼ系等によるin vivoにおける部位特異的遺伝子組換えを用いることもできる。また、レトロウィルスを使用して、非ヒト動物へ目的タンパク質のトランスジーンを導入する方法も報告されている。

マイクロインジェクション法によるトランスジェニック動物作製方法は、例えば、以下に示すようにして行われる。

まず、発現制御に関わるプロモーター、特定のタンパク質をコードする遺伝

子、ポリ A シグナルから基本的に構成されるトランスジーンが必要である。プロモーター活性により特定分子の発現様式や発現量が左右され、また、導入トランスジーンのコピー数や染色体上の導入部位により作製されたトランスジェニック動物が系統間で異なるため、各系統間で発現様式・発現量を確認する。

5 非翻訳領域やスプライシングにより発現量が変化することが判明しているため、予めポリ A シグナルの前にスプライシングされるイントロン配列を導入してもよい。受精卵に導入する遺伝子はできるだけ純度の高いものを使用することが重要である。使用する動物としては、受精卵採取用マウス（5～6 週齢）、交配用雄マウス、偽妊娠雌マウス、輸精管結紮雄マウス等が用いられる。

10 効率よく受精卵を得るために、ゴナドトロピン等により排卵を誘発してもよい。受精卵を回収し、マイクロインジェクション法にて卵子の雄性前核にインジェクションピペット中の遺伝子を注入する。注入した卵子を輸卵管に戻すための動物（偽妊娠雌マウス等）を用意し、一匹に対して約 10～15 個を移植する。その後、誕生したマウスにトランスジーンが導入されているか否かを、  
15 尾の先端部からゲノム DNA を抽出し、サザン法あるいは PCR 法によりトランスジーンを検出するか、あるいは相同組み換えが起こったときのみに活性化  
するマーカー遺伝子を挿入したポジティブクローニング法により確認することができる。さらに、トランスジーンが発現を確認するため、ノザン法もしくは  
20 RT-PCR 法によりトランスジーン由来転写産物を検出する。または、タンパク質に対する特異的抗体によって、ウェスタンブロッティングを行ってもよい。

本発明のノックアウトマウスは、mBSSP6 遺伝子の機能が失われるように処理されたものである。ノックアウトマウスとは相同組換え技術により任意の遺伝子を破壊し、機能を欠損させたトランスジェニックマウスをいう。ES  
25 細胞を用いて相同組換えを行い、一方の対立遺伝子を改変・破壊した胚性幹細胞を選別し、ノックアウトマウスを作製することができる。例えば、受精卵の胚盤胞や桑実胚期に遺伝子を操作した胚性幹細胞を注入して、胚性幹細胞由来の細胞と胚由来の細胞が混ざったキメラマウスを得る。このキメラマウス（キメラとは、2 個以上の受精卵に基づいた体細胞で形成される単一個体をいう）

と正常マウスを交配すると、一方の対立遺伝子の全てが改変・破壊されたヘテロ接合体マウスを作製することができる。さらに、ヘテロ接合体マウス同士を交配することで、ホモ接合体マウスが作製できる。

5 相同組換えとは、遺伝子組換え機構で塩基配列が同じ、または非常に類似している2つの遺伝子間で起こる組換えのことをいう。相同組換えを起こした細胞の選別にはPCRを使用することができる。挿入遺伝子の一部と挿入が期待される領域の一部をプライマーとして用いるPCR反応を行い、増幅産物ができた細胞で相同組換えを起こしていることが判明できる。また、胚幹細胞で発現している遺伝子に相同組み換えを起こさせる場合には、導入遺伝子にネオマイシン耐性遺伝子を結合させておき、導入後に細胞をネオマイシン耐性にさせることにより選択することができる等、公知の方法およびそれらの変法を用いて容易に選択することができる。

10 本発明はまた、hBSSP6もしくはmBSSP6を認識する抗体を提供する。本発明の抗体には例えば、配列番号2、4または6のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するタンパク質またはその断片に対する抗体が含まれる。hBSSP6もしくはmBSSP6または本発明のhBSSP6もしくはmBSSP6の断片に対する抗体（例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ペプチド抗体）または抗血清は、本発明のhBSSP6もしくはmBSSP6またはその断片等を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

20 本発明のhBSSP6もしくはmBSSP6またはその断片は、投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体または希釈剤、担体と共に温血動物に対して投与される。投与に際して抗体産生を高めるために、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与しても良い。投与は通常1～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ等が挙げられるが、マウスおよびラットが好ましくは用いられる。ラットにはWistarおよびSD系ラット等が好ましく、マウスにはBALB/c、C57BL/6およびICR系マウス等が好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められる個体を選択し、最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識化hBSSSP6またはmBSSSP6と抗血清とを反応させた後、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、例えばケーラーとミルスタインの方法 (Nature, 256, 495, 1975) やその変法 (J. Immunol. Method, 39, 285, 1980, Eur. J. Biochem., 118, 437, 1981, Nature, 285, 446, 1980) に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウイルス等が挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。さらに融合効率を高めるために、適宜レクチン、ポリ-L-リジンもしくはDMSOを添加することもできる。

骨髓腫細胞としては例えばX-63Ag8、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1等が挙げられるが、好ましくはSP2/0が用いられる。用いられる抗体産生細胞 (脾臓細胞) 数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:20～20:1であり、PEG (好ましくはPEG1000～PEG6000) を10～80%程度の濃度で添加し、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。抗BSSSP6抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、hBSSSP6もしくはmBSSSP6抗原を直接または担体と共に吸着させた固相 (例えば、マイクロプレート) にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体 (細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる) またはプロテインAを加え、固相に結合した抗hBSSSP6もしくはmBSSSP6抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素等で標識したBSSSP6を加え、固相に結合した抗BSSSP6モノクローナル抗体を検出する方法等が挙げられる。

抗hBSSSP6もしくはmBSSSP6モノクローナル抗体の選別およびクロー

ニングは、自体公知またはそれに準じる方法に従って行うことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行われる。選別、クローニングおよび育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地、またはハイブリドーマ培養用無血清培地等を用いることができる。培養温度は、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行われる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗hBSSP6もしくはmBSSP6抗体価の測定と同様にして測定できる。すなわち、測定方法としてはラジオイムノアッセイ（RIA）法、酵素免疫測定法（ELISA）法、FIA（蛍光イムノアッセイ）法、プラーク測定法、凝集反応法等を用いることができるが、以下に示すようなELISA法が好ましい。

#### ELISA法によるスクリーニング

免疫抗原と同様の操作で調製したタンパク質をELISAプレートの各ウェルの表面に固定化する。次に、非特異的吸着を防止する目的で、BSA、MSA、OVA、KLH、ゼラチンもしくはスキムミルク等を各ウェルに固定化する。この各ウェルにハイブリドーマ培養上清液を添加し、一定時間放置し免疫反応を行わせる。PBS等を洗浄液として各ウェルを洗浄する。この洗浄液中には界面活性剤を添加することが好ましい。酵素標識二次抗体を添加し一定時間放置する。標識酵素としては、β-ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ等を用いることができる。同じ洗浄液で各ウェルを洗浄後、使用した標識酵素の基質溶液を添加し酵素反応を行わせる。添加したハイブリドーマ培養上清液中に目的とする抗体が存在する場合は酵素反応が進行し基質溶液の色が変化する。

クローニングは、通常半固体アガー法や限界希釈法等のそれ自体公知の方法で行うことができ、具体的には前記の方法で目的とする抗体を産生するウェルを確認した後、クローニングを行いシングルクローンを得る。クローニング法としては、培養プレート1ウェルあたりに1個のコロニーが形成するようにハイブリド



ーマ細胞を希釈して培養する限界希釈法等を用いると良い。限界希釈法によるクローニングには、コロニー形成能と高めるために支持細胞を用いるか、インターロイキン6などの細胞増殖因子を添加しても良い。その他、FACSおよびシングルセルマニピレーション法を用いてクローニングすることができる。クローン化されたハイブリドーマを、好ましくは無血清培地中で培養し、至適量の抗体をその上清に加える。この様にして得られた単一のハイブリドーマは、フラスコや細胞培養装置を用いて大量培養を行うか、動物の腹腔内で培養する（J. Immunol. Meth., 53, 313, 1982）ことにより、モノクローナル抗体を得ることができる。フラスコ内で培養を行う場合は、0～20%のFCSを含む細胞培養用培地（IMDM、DMEM、RPMI 1640およびMEM等）を用いて行うことができる。動物の腹腔内で培養する場合は、細胞融合に使用した骨髓腫細胞の由来となった動物と同種、同系統の動物または胸腺欠損ヌードマウス等を使用することが好ましく、予めプリスタン等の鉱物油を投与してからハイブリドーマを移植する。1～2週間後腹腔内に骨髓腫細胞が増殖し、モノクローナル抗体を含む腹水を得ることができる。

本発明によるモノクローナル抗体は、hBSSP6もしくはmBSSP6に特異的なエピトープを認識するものを選択することによって、他のタンパク質と交差しないものとすることができる。一般的にそのタンパク質を構成するアミノ酸配列の中から、連続する少なくとも3以上のアミノ酸残基、望ましくは7～20アミノ酸のアミノ酸配列によって提示されるエピトープは、そのタンパク質に固有のエピトープを示すと言われている。従って、配列番号2、4または6のいずれかに記載されたアミノ酸から選択され、かつ連続する少なくとも3アミノ酸残基から成るアミノ酸配列を持つペプチドによって構成されるエピトープを認識するモノクローナル抗体は、本発明におけるhBSSP6もしくはmBSSP6特異的なモノクローナル抗体といえる。配列番号2、4および6に記載されたアミノ酸配列の間で保存されたアミノ酸配列を選べば、BSSP6ファミリーに共通のエピトープを選択することができる。あるいは各配列に特異的なアミノ酸配列を含む領域であれば、それぞれのタンパク質の識別が可能なモノクローナル抗体を選択することができる。

抗hBSSP6またはmBSSP6モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。公知の精製法としては、例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、硫酸沈殿法、イオン交換体（例えばDEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲル濾過法、抗原結合固相またはプロテインAもしくはプロテインG等の活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法のような手法を施すことができる。精製過程において凝集物の形成や抗体価の低下を防止する目的で、例えばヒト血清アルブミンを0.05～2%の濃度で添加する。その他、グリシン、 $\alpha$ -アラニン等のアミノ酸類、特にリジン、アルギニンおよびヒスチジン等の塩基性アミノ酸、グルコースやマンニトール等の糖類または塩化ナトリウム等の塩類を添加しても良い。1gM抗体の場合、特に凝集しやすいことが知られているため、 $\beta$ -プロピオニラクトンおよび無水酢酸で処理しても良い。

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアタンパク質との複合体を作り、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行い、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造することができる。温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアタンパク質との複合体に関し、キャリアタンパク質の種類およびキャリアとハプテンとの混合比は、キャリアに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率よくできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させても良いが、例えばウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカップリングさせる方法が用いられる。また、ハプテンとキャリアのカップリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬などが用いられる。縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤と共に投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全

フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与しても良い。投与は、通常2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行われる。ポリクローナル抗体は上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水等、好ましくは血液から採取することができる。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。

hBSSP6もしくはmBSSP6またはその断片に対するモノクローナル抗体ならびにポリクローナル抗体は、hBSSP6もしくはmBSSP6を発現している細胞に関連する疾病の診断や治療に利用することが可能である。これらの抗体を用いて、本発明のhBSSP6もしくはmBSSP6またはその断片との免疫学的な結合に基づき、hBSSP6もしくはmBSSP6またはその断片を測定することができる。具体的には、これらの抗体を用いてhBSSP6もしくはmBSSP6もしくはその断片を測定する方法としては、例えば、不溶性担体に結合させた抗体と標識化抗体とによりhBSSP6もしくはmBSSP6またはその断片を反応させて生成したサンドイッチ錯体を検出するサンドイッチ法、また、標識化hBSSP6もしくはmBSSP6と検体中のhBSSP6もしくはmBSSP6またはその断片を抗体と競合的に反応させ、抗体と反応した標識抗原量から検体中のhBSSP6もしくはmBSSP6またはその断片を測定する競合法を利用して検体中のhBSSP6もしくはmBSSP6またはその断片を測定する方法が挙げられる。

サンドイッチ法によるhBSSP6もしくはmBSSP6またはその断片の測定においては、まず、固定化抗体とhBSSP6もしくはmBSSP6またはその断片とを反応させた後、未反応物を洗浄によって完全に除去し、標識化抗体を添加して固定化抗体-hBSSP6もしくはmBSSP6標識化抗体を形成させる2ステップ法もしくは固定化抗体、標識化抗体およびhBSSP6もしくはmBSSP6またはその断片を同時に混合する1ステップ法などを用いることができる。

測定に使用される不溶性担体は、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリブ

ロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアクリル酸エステル、ナイロン、ポリアセタール、フッ素樹脂等の合成樹脂、セルロース、アガロース等の多糖類、ガラス、金属等が挙げられる。不溶性担体の形状としては、例えばトレイ状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、試験管等の種々の形状を用いることができる。抗体を吸着した担体は、適宜アジ化ナトリウム等の防腐剤の存在下、冷所に保存する。

抗体の固層化には、公知の化学的結合法または物理的吸着法を用いることができる。化学的結合法としては例えばグルタルアルデヒドを用いる方法、N-スクシニイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサノ-1-カルボキレートおよびN-スクシニイミジル-2-マレイミドアセテートなどを用いるマレイミド法、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸などを用いるカルボジイミド法が挙げられる。その他、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニイミドエステル法、N-サクシミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸法、ビスジアゾ化ベンジジン法、ジパルミチルリジン法が挙げられる。あるいは、先に被検出物質とエピトープの異なる2種類の抗体を反応させて形成させた複合体を、抗体に対する第3の抗体を上記の方法で固層化させておいて捕捉することも可能である。

標識物質としては、酵素、蛍光物質、発光物質、放射性物質および金属キレート等を使用するのが好ましい。酵素としては、例えばペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルター5-ステロイドイソメラーゼ、 $\alpha$ -グリセロールホスフェートデヒドロゲナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、西洋わさびパーオキシダーゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ等が挙げられ、蛍光物質としては、例えばフルオレセインイソチアネート、フィコビリプロテイン、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、オルトフタルアルデヒド等が挙げられ、発光物質としてはイソルミノール、ルシゲニン、ルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩

およびその修飾エステル、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、エクオリン等が挙げられ、放射性物質としては $^{125}\text{I}$ 、 $^{127}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 等が挙げられるが、これらに限らず免疫学的測定法に使用することができるものであれば特に限定されない。さらに、抗体にビオチン、ジニトロフェニル、ピリドキサルまたはフルオレサミンの様な低分子ハプテンを結合させても良い。好ましくは西洋わさびペルオキシダーゼを標識化酵素として用いる。本酵素は多くの基質と反応することができ、過ヨウ素酸法によって容易に抗体に結合させることができる。

標識化剤が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤を用いる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質溶液として $\text{H}_2\text{O}_2$ を用い、発色剤として2, 2'-アジノージー [3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸] アンモニウム塩 (ABTS)、5-アミノサリチル酸、オルトフェニレンジアミン、4-アミノアンチピリン、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン等を使用することができ、酵素にアルカリフォスファターゼを用いる場合は基質としてオルトニトロフェニルフォスフェート、パラニトロフェニルリン酸等を使用することができ、酵素に $\beta$ -D-ガラクトシダーゼを用いる場合は基質としてフルオレセイノージー ( $\beta$ -D-ガラクトピラノシド)、4-メチルウンベリフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド等を使用することができる。本発明には、また、前述のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体および試薬類をキット化したものも含まれる。

架橋剤としては、N, N'-オルトフェニレンジマレイミド、4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、6-マレイミドヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、4, 4'-ジチオピリジン、その他公知の架橋剤が利用可能である。これらの架橋剤と酵素および抗体との反応は、それぞれの架橋剤の性質に応じて既知の方法に従って行えばよい。また、抗体としては、場合によっては、そのフラグメント、例えばF a b'、F a b、F (a b')<sub>2</sub>を用いる。また、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体にかかわらず同様の処理により酵素標識体を得ることができる。上記架橋剤を用いて得られる酵素標識体をアフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法にて精製すれ

ば、更に感度の高い免疫測定系が可能となる。精製した酵素標識化抗体は、安定剤としてチメロサルもしくはグリセリン等を加えて、あるいは凍結乾燥して冷暗所に保存する。

5 測定対象は、血漿、血清、血液、尿、組織液、脳脊髄液等の体液等、hBSSSP6もしくはmBSSSP6またはその断片を含む試料あるいはこれらの前駆体またはその断片を含む試料であれば限定されない。

以下、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### 10 実施例1 新規セリンプロテアーゼのクローニング

human brain cDNA library (Clontech社) を鋳型にして、プライマー配列1 ; GTG CTC ACN GCN GCB CAY TG (配列番号36)、2; CCV CTR WSD CCN CCN GGC GA (配列番号37) に示すセリンプロテアーゼに共通のアミノ酸に対応する塩基配列のプライマーを用いたPCR法でクローニングを行った。すなわち鋳型を5  
15  $\mu$  l、 $10\times$  ExTaqバッファーを5  $\mu$  l、dNTPを5  $\mu$  l、上記プライマーを各10 pmol、ExTaq (TAKARA社製) を0.5  $\mu$  l 加え滅菌水で全量を50  $\mu$  l とし、94℃、0.5分、55℃、0.5分、72℃、1分のサイクルで35回PCRを行った。このPCR産物をTOPO TAクローニングキット (Invitrogen社) 添付のpCRII-TOPOベクターと混ぜ、室温で5分  
20 間放置した。その後常法通りにキット添付の大腸菌Top 10に形質転換し、LB (Amp+) プレート (100  $\mu$  g/ml のアンピシリンを含有する) に播いた。得られた各コロニーから常法通りにプラスミド抽出し、蛍光シーケンサー (ABI社) を用いてサイクルシーケンス法による塩基配列の決定を行った。得られた各クローンの配列をGenBankで相同性を調べ、未知であったクロー  
25 ーン、BSSP6遺伝子について5' RACE、3' RACE法によりcDNA全長を得、上記法と同じく塩基配列の決定を行った。これらについて、ノザン・ブロット解析を行った結果、脳および前立腺に強力な発現が認められた。さらに、脳と前立腺のmRNAの大きさが異なっていた。そこで、BSSP6クローン特異的プライマー、GSP1プライマー (hBSSP6F1 (配列番号18) または

hBSSP6R2 (配列番号 24)、および GSP2 プライマー (hBSSP6F2 (配列番号 19) または hBSSP6R1 (配列番号 23)) を作製し、human brain Marathon-Ready cDNA (Clontech社) および human prostate Marathon-Ready cDNA (Clontech社) を用いてそれぞれこの試薬に付属する AP1 プライマーと上記 GSP1 プライマーのいずれかで 94℃、2分を 1 サイクル、94℃、30秒、60℃、30秒、72℃、30秒を 35 サイクルする PCR を行った。次に、この PCR 産物を 1/100 に希釈したものを 5  $\mu$ l、10×バッファーを 5  $\mu$ l、dNTP を 5  $\mu$ l、10  $\mu$ M の上記 GSP2 プライマーのいずれかを 10 pmol、試薬に付属する AP2 プライマーを 10 pmol、ExTaq を 0.5 ユニット、滅菌水で全量を 50  $\mu$ l とし、先と同様に PCR を行った。この PCR 産物を上記 TOPOTA クローニングキットを用いてクローニングし、シーケンスを行い前記クローンの上流、下流領域を得た。この際、タンパク質の全長をカバーしていないと思われるクローンについては更に、新たに判明した塩基配列に基づいて特異的プライマーを作製した。またこの配列を基にして ORF を増幅できるような表 1 に示すプライマー (脳型 (brain) および前立腺型 (pros.) hBSSP6 の各々の mRNA を増幅するために異なる Forward プライマーを設計した) を作製し、human brain Marathon ready cDNA および human prostate Marathon ready cDNA を鋳型として PCR を行い同一クローンであることを確認し、これを TOPOTA クローニングキットに添付の pCRII-TOPO ベクターにクローニングし、全長の cDNA クローンが入ったプラスミド pCRII/hBSSP6 を得た。同様に GSP1、GSP2 を mouse brain Marathon-Ready cDNA (Clontech社) を鋳型にして 5' RACE、3' RACE 法を行い、クローニングしてマウスの相同性のある遺伝子 pCRII/mBSSP6 を得た。配列番号 1 および 3 に hBSSP6 および mBSSP6 をコードする cDNA の塩基配列を、配列番号 2 および 4 にこれらの塩基配列から推定される hBSSP6 タンパク質および mBSSP6 のアミノ酸配列を示す。

表 1

配列番号	プライマー名	向き	配 列	用途
human BSSP6				
1 8	hBSSP6F1	Forward	TCAAGCCCCGCTACATAGTT	RACE
1 9	hBSSP6F2	Forward	ATCATGCTGGTGAAGATGGC	RACE
2 0	hBSSP6F3	Forward	GGACTCAAGAGAGGAACCTG	全長用 (brain)
2 1	hBSSP6F4	Forward	ATCATCAAGGGGTTCGAGTG	mature
2 2	hBSSP6F5	Forward	CTGCCTTGCTCCACACCTGG	全長用 (pros.)
2 3	hBSSP6R1	Reverse	TTCTCACACTTCTGGTGCTC	RACE
2 4	hBSSP6R2	Reverse	ATGGTGTCTGTGATGTTGCC	RACE
2 5	hBSSP6R3/P	Reverse	AACTGCAGGAACCAAACACCAAGTGG	全長用
mouse BSSP6				
2 6	mBSSP6F1	Forward	CGACTTCAACAACAGCCTCC	RACE
2 7	mBSSP6F2	Forward	CTTCTTTACCCGAGCTGTGC	RACE
2 8	mBSSP6F3	Forward	TAAGCTAGGAGAACTGAGGC	全長用 (pros.)
2 9	mBSSP6F4	Forward	ATCAAGGGTTATGAGTGC	mature
3 0	mBSSP6F5	Forward	CTTACAGGCTTGGGGATTG	全長用 (brain)
3 1	mBSSP6R1	Reverse	GATGATGCCTTGAAGAGATC	RACE
3 2	mBSSP6R2	Reverse	CATGGTGTCTGTGATGTTGCC	RACE
3 3	mBSSP6R3/E	Reverse	CGGAATTCGCATTAAGAAGAGGTTGGAG	全長用

実施例 2      h B S S P 6 もしくは m B S S P 6 遺伝子のヒトおよびマウス臓器での発現

- 5      B a l b / c マウスあるいはその胎児の各種臓器ならびにヒトの各種組織から、QuickPrep Micro mRNA purification Kit (Amersham-Pharmacia) のプロトコルに従い、mRNAを単離した。これらを常法通りに電気泳動し、ナイロンメンブ
- 10      ランに転写した。このフィルターを p C R I I / m B S S P 6 および p C R I I / h B S S P 6 より m B S S P 6 の成熟体をコードする部分 (配列番号 3、塩基番号 2 4 4 ~ 9 3 0) および h B S S P 6 の成熟体をコードする部分 (配列番号 1、塩基番号 2 7 2 ~ 9 5 8) をそれぞれ単離・精製し、 $\alpha$ - $^{32}$ P d C T P で標識したプローブを 5 × S S C で希釈したものと、6 5 °C で一昼夜反応させた。同様に、human multiple tissue blot、human multiple tissue blot II、human brain multiple tissue blot II、human brain multiple tissue blot IV
- 15      (Clontech社製) 膜を p C R I I / h B S S P 6 の成熟体をコードする部分を単離・精製し、 $\alpha$ - $^{32}$ P d C T P で標識したプローブを 5 × S S C で希釈したも



のと、65℃で一昼夜反応させた。その後、フィルターを2×SSC/0.1%SDSで室温30分間、1×SSC/0.1%SDSで室温30分間、0.1×SSC/0.1%SDSで65℃30分間で2回洗い、FLA 2000用イメージングプレート（富士フイルム社）に1日露光させ、解析した。human multiple tissue blot膜（図1）、human multiple tissue blot II（図2）、human brain multiple tissue blot II（図3）、human brain multiple tissue blot IV（図4）、ヒトの精巣、前立腺および粘液腺から調製したmRNA（図5）、15日目のマウス胎児、生後12日および1年のマウスの脳から調製したmRNA、生後3ヶ月のマウスの前立腺、精巣、胎盤から調製したmRNA（図6）を用いた結果を示す。また、上記で作製したmRNAをReady To Go RT-PCR Beads（Amersham-Pharmacia）を用いてキット添付のプロトコール通りにhBSSP6およびmBSSP6について遺伝子特異的プライマー（配列番号18および25）を用いてRT-PCRを行った。図1～図6に示すように、ノザン・ブロット解析の場合、hBSSP6は脳の各種部位、胎盤、肺、心臓、精巣、前立腺、粘膜腺等で発現を示し、mBSSP6は胎児の脳、前立腺および精巣で発現が認められた。また、RT-PCR解析の場合、hBSSP6は成体の海馬および前立腺で発現が認められ、mBSSP6は新生児から生後12日マウスの脳および前立腺で発現が認められた。ゆえに、胎盤、肺、心臓、精巣、前立腺、粘膜腺および脳において、本新規セリンプロテアーゼが様々な役割を担っていると予想される。

実施例3 hBSSP6もしくはmBSSP6遺伝子がコードする新規セリンプロテアーゼ成熟タンパク質の発現

（1）発現プラスミドの構築

プラスミドpCRII/hBSSP6またはpCRII/mBSSP6をテンプレートに、hBSSP6タンパク質またはmBSSP6タンパク質の成熟体タンパク質をコードするcDNA領域（ヒト：配列番号1、塩基番号272～958；マウス：配列番号3、塩基番号244～930）をPCR反応にて増幅した（ヒトについては配列番号21および配列番号25の配列を有するプライマーを、

マウスについては配列番号 29 および配列番号 33 の配列を有するプライマーを使用した)。この PCR 産物をそれぞれ pTrc-HisB (Invitrogen) を BamHI で消化後、マングビーン・ヌクレアーゼで平滑末端にしたものに常法通りにライゲーションし、大腸菌 JM109 を形質転換させ、生じたコロニーを PCR 法にて解析して目的とするセリンプロテアーゼ発現プラスミド pTrcHis/hBSSP6 および pTrcHis/mBSSP6 を含む大腸菌を得た。

得られた大腸菌は、それぞれ E. coli pTrcHis/hBSSP6 および E. coli pTrcHis/mBSSP6 と命名し、1998 年 10 月 29 日より、受託番号 FERMP-17039 および FERMP-17036 の下、日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1-3 通商産業省工業技術院生命工学技術研究所に寄託してある。

#### (2) 発現プラスミドを含む大腸菌でのタンパク発現

発現プラスミドを持つ大腸菌のシングルコロニーを 10 ml の LB (Amp+) 培地に接種し、一晚 37℃ で培養した。これを 250 ml の LB (Amp+) 培地に接種し、37℃ で培養した。600 nm の吸光度が 0.5 になった時、250  $\mu$ l の 0.1 M IPTG (イソプロピル- $\beta$ -D (-) チオガラクトピラノシド) を加え、更に 5 時間培養した。この大腸菌を遠心分離後、菌体破壊バッファー (10 mM リン酸バッファー pH 7.5、1 mM EDTA) で懸濁し、氷上で超音波処理を行うことで大腸菌を破壊し、14,000 rpm、4℃ で 20 分遠心して沈殿を得た。この沈殿物を 0.5% Triton X-100 を含む菌体破壊バッファーで 2 度洗浄し、Triton X-100 を取り除くために水洗した後に 8 M の尿素を含む変性バッファー (8 M 尿素、50 mM Tris、pH 8.5、20 mM 2ME) で 37℃ で 1 時間浸透することで溶解した。この溶解液を TALON metal affinity resin (Clontech 社製) に通し、10 mM イミダゾール含有変性バッファーで洗浄後、100 mM イミダゾール含有変性バッファーで溶出し、精製した。この精製物を PBS で一晚おきにバッファー交換しながら 3 日間透析し、タンパク質 hBSSP6-His および mBSSP6-His を得た。

実施例4 B S S P 6 遺伝子がコードする新規セリンプロテアーゼ成熟タンパク質の p F B T r y p S i g T a g / B S S P 6 を用いた発現および酵素活性の測定

(1) p F B T r y p S i g T a g / B S S P 6 の作製

5 配列番号7および8の配列を有するオリゴヌクレオチドをアニールさせてN h e I と B a m H I 消化したフラグメントをN h e I - B a m H I 消化した p S e c T a g 2 A (Invitrogen社製) に挿入し、p S e c T r y p H i s とした。5  $\mu$  g の p S e c T r y p H i s ベクターに対して20単位のB a m H I を加え、37℃で4時間かけて切断した後、6単位のマングビーンヌクレアーゼ(宝酒造)を加えて室温(25℃)で30分間反応させて末端を平滑化した。更に、20単位のX h o I でクローニングサイトの3'側を切断した後、1単位の bacterial alkaline phosphatase (宝酒造)を加えて65℃で30分反応した。

15 特開平9-149790または Biochim. Biophys. Acta, 1350, 11, 1997 に記載されている方法に準じて、C O L O 2 0 1 細胞よりmRNAを調製し、cDNAを合成し、プラスミドp S P O R T / ニューロシンをクローニング得た。p S P O R T / ニューロシンより、配列番号9および10の配列を有するプライマーを用いてPCRを行い、ニューロシン活性型領域のcDNAを得た。このPCR産物の3'側のX h o I サイトを10 unitのX h o I で、37℃、3時間反応させることにより切断した。これとp S e c T r y p H i s をTAKARAライゲーションキットを用いて挿入し、p S e c T r y p H i s / ニューロシンを得た(図7)。

25 配列番号11及び12の配列を有するプライマーを用いてp S e c T r y p H i s / ニューロシンのトリプシンシグナルからエンテロキナーゼ認識部位までの部分にLeu-Val-His-GlyのペプチドがC末端にくるように増幅する。これをp S e c T a g 2 A のN h e I とH i n d IIIサイトに挿入しプラスミドp T r y p S i g を作製した。

プラスミドp S e c T a g 2 A の1  $\mu$  g (0.1  $\mu$  l) を制限酵素N h e I およびB a m H I で処理することにより、I g G k のリーダー配列をコードする領域を完全に除去した。この溶液に対して、配列番号38および39の配列を有す

るDNAをそれぞれ100 pmol ずつ加え、70℃で10分間熱処理した後室温で30分間放置してアニーリングした。Nhe I と BamH I で処理したHis 分泌シグナル配列と pSecTag2A 1 μl ずつにDNAライゲーションキットVer. 2 (宝酒造株式会社) のI液を2.0 μl 加え、16℃で、30分間反応させた。

反応液に大腸菌コンピテントセルXL1-Blue (STRATAGENE社) 0.1 ml を加え、氷上で30分間反応させた後、42℃で、60秒間熱ショックを与えた。2分間氷上に置いた後、SOC培地 (東洋紡績株式会社) を0.9 ml 加え、37℃で、1時間シェーカーで振とう培養した。5,000 rpmで1分間遠心分離して、上清を廃棄した。遠心管内に残った溶液で沈殿したコンピテントセルを懸濁し、100 μg/ml のアンピシリンを含むアンピシリンLBプレートに播いた。37℃で、1晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドのうち、His 分泌シグナルのDNAが挿入されているものをPCRで選択し、それを pTrypHis とした。

pTrypHis のHis Tag 領域を含むおよそ200 bp を配列番号12及び13の配列を有するプライマーを用いて増幅し、HindIII と BamH I による消化で生じたHis Tag とエンテロキナーゼ認識部位を含むおよそ40 bp の断片をpTrypSig に挿入してpTrypSigTag を作製した (図8A)。

pTrypSigTag のトリプシンシグナル配列からエンテロキナーゼ認識部位までを配列番号10と14の配列を有するプライマーを用いたPCRによって作製したcDNAをBglII と BamH I 消化によって切り出し、pFastBAC1 (GIBCO) のBamH I サイトに挿入した。挿入方向を配列番号10と15の配列を有するプライマーを用いたPCRによって確認し、ポリヘドリンプロモーターによって転写・翻訳される方向に挿入されたクローンを選択し、pFBTrypSigTag とした。

5 μg のpFBTrypSigTag ベクターに対して20単位のBamH I を加え、37℃で4時間かけて切断した後、6単位のマングベーンヌクレアーゼ (宝酒造) を加えて室温 (25℃) で30分間反応させて末端を平滑化した。更に、

20単位のEcoRIでクローニングサイトの3'側を切断した後、1単位の細菌アルカリホスファターゼ（宝酒造）を加えて65℃で30分反応した。

E. coli pTrcHis/hBSSP6（受託番号FERM P-17039）から得られるpTrcHis/hBSSP6またはpCRII/hBSSP6より配列番号16および配列番号17の配列を有するプライマーを用いてPCRを行い、hBSSP6の活性体領域のcDNAを得た。得られたcDNAをpFBTrypSigTagに挿入しpFBTrypSigTag/hBSSP6を得た（図7B）。この際、蛍光標識した配列番号11の配列を有するプライマーを用いて塩基配列を決定することにより、正しくhBSSP6が挿入されているかを確認した。E. coli pTrcHis/mBSSP6（受託番号FERM P-17036）から得られるpTrcHis/mBSSP6または実施例1で得たpCRII/mBSSP6を用いて同様にmBSSP6の活性体領域のcDNAを得て、以下と同様の方法により、mBSSP6を発現させることができる。

pFBTrypSigTag/hBSSP6をGibco BRL BAC-TO-BAC baculovirus expression systemのプロトコールに従ってバクミドDNA上にTrypsinogen signal peptide、His tag及びエンテロキナーゼ認識部位を融合したキメラhBSSP6を持つ組み換えバクミドを作製した。これをBAC-TO-BAC baculovirus expression systemのマニュアルに従いSf-9細胞で発現させたところ、ウィルス感染後2日目より培養上清中に分泌された。

## （2）酵素活性の測定

この培養上清中に得られた組換え融合タンパク質hBSSP6をキレートカラムに通し精製し、透析後、酵素活性を測定した。まず、培養上清をPBSバッファーを用いてキレートカラム（Ni-NTA-Agarose, Qiagen社製）に供し、PBSにイミダゾール（和光純薬工業）を溶解した溶液で段階的に溶出した。得られたイミダゾール溶出分画を、さらにPD-10カラム（Pharmacia社製）でPBSバッファーに交換した。このサンプル50μLにエンテロキナーゼ（1U/1μL, Invitrogen社製）10μLを混和し、室温で60分反応させた。次に各種合成基質（ペプチド研究所）をDMSOに溶

解し、1M Tris-HCl (pH 8.0) で希釈した0.2M基質溶液を50  $\mu$ L加え、さらに、37°Cで反応した。1時間後に励起波長380nm、蛍光波長460nmにおける、酵素作用に生じるAMC (7-アミノ-4-メチルクマリン) の蛍光を測定することにより、活性を測定した(図9)。なお、図に示した値は、エンテロキナーゼのみの蛍光値を差し引いた値を示している。

#### 実施例5 抗hBSSP6抗体の作製

以下の手順に従って、抗hBSSP6抗体を作製した。

##### (1) 免疫処置

8週齢の雌性Balb/cマウス5匹に対し、実施例4にて得た組み換えhBSSP6タンパク質溶液をフロイント完全アジュバント(DIFCO社製)と1:1で混和しエマルジョン化したものを、組み換えhBSSP6タンパク質が約100  $\mu$ g/匹となるよう皮下注射した。以後、ほぼ2週間毎に3回追加免疫を行い、免疫用抗原溶液をフロイント不完全アジュバント(DIFCO社製)と1:1で混和しエマルジョン化したものを組み換えhBSSP6タンパク質が約100  $\mu$ g/匹となるよう調製し、皮下注射した。2回目の追加免疫の3日後に尾静脈より採血し、血清中の抗体価をELISA法により測定した。高い抗体価を有していたマウスについて、3回目の追加免疫の2週間後に生理食塩液に溶解した組み換えhBSSP6タンパク質が約100  $\mu$ g/匹となるよう腹腔内投与し、その3日後に免疫したマウスの脾臓細胞を細胞融合に用いた。

##### (2) ELISA法(直接固相法)

免疫用抗原と同様の方法で調製した組み換えhBSSP6タンパク質のタンパク質溶液をPBSで5  $\mu$ g/mLに調製し、50  $\mu$ L/ウェルでELISAプレートに2時間吸着させた。精製水で5回洗浄後、PBSで4倍に希釈したブロックエース(雪印乳業社製)でブロッキングを行った。その後洗浄し、(1)で得られた血清を血清希釈用バッファー(5%FBSを含むPBS)で5,000倍に希釈し、50  $\mu$ L/ウェルずつ加え、室温で2時間反応させた。プレートを洗浄後、2000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識マウスIgG抗体(ICN/Cappel社製)を50  $\mu$ L/ウェルずつ加え、室温で1時間反応させた。p

ーニトロフェニルホスフェート二ナトリウム (Nitrophenyl Phosphate, Disodium, SIGMA 104 phosphatase substrate tablets) を基質反応液 (0.5 mM 塩化マグネシウムを含む 9.6% ジエタノールアミン緩衝液 (pH 9.7)) に 2 mg/mL の濃度になるよう溶解し、基質溶液を調製した。精製水で 7 回プレートを洗淨し、該基質溶液を 50  $\mu$ L / ウェルとなるように加えた。該基質溶液と 30 分間反応させた後、50  $\mu$ L の 3N NaOH を加え反応を停止させ、405 nm の吸光度を測定した。

### (3) 細胞融合、ハイブリドーマの作製

(2) の ELISA 法の結果により組み換え hBSSP6 タンパク質に対する抗体価の上昇が認められたマウス 3 匹から最終免疫の 3 日後に脾臓を摘出し、常法により脾細胞を調製した。

細胞融合時の親株は、事前に 20  $\mu$ g/mL の 8-アザグアニンを含む培地で選択し、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT) 欠損株であることを確認した Balb/c マウス由来ミエローマ SP2 細胞株を用いた。SP2 細胞  $2 \times 10^7$  個と脾細胞  $1 \times 10^8$  個をあわせ、ポリエチレングリコール 4000 (PEG 4000; Merck 社製) を細胞融合促進剤として使用し、常法に従い細胞融合を行った。融合後の細胞は脾細胞換算で  $3.0 \times 10^8$  個/mL になるようにエスロン培地 (三光純薬製) にヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジンを加えた培地 (HAT 培地) に懸濁し 96 ウェルマイクロプレート (Corning 社製) に 100  $\mu$ L / ウェルずつ分注した。該融合細胞を CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C、5% CO<sub>2</sub>) で 3~5 日毎に半量ずつ培地交換を行いながら培養した。HAT 培地で培養可能なハイブリドーマのみ選択培養した。

### (4) ハイブリドーマのスクリーニング

コロニー形成の確認されたウェルについて、培養上清中の組み換え hBSSP6 タンパク質に対して特異的に反応する抗体の有無を確認するために、(2) で示したのと同じ ELISA 法でプレートに組み換え hBSSP6 タンパク質および組み換え hBSSP6 タンパク質そしてトリプシノーゲンの三種類を用い、スクリーニングを行い、組み換え hBSSP6 タンパク質のみに強く反応するコロ

ニーを選択し、クローニングに供した。

(5) ハイブリドーマのクローニング

組み換え h B S S P 6 タンパク質に対して結合する抗体を産生するハイブリドーマについて限界希釈法によるクローニングを 3 回繰り返し行い、組み換え h B S S P 6 タンパク質に対して特異的に結合する抗体を産生し、且つ安定した増殖能を有するハイブリドーマ F B 6 M A 1 1 細胞株および F B 6 M A 5 3 細胞株の 2 種を得た。

(6) モノクローナル抗体のタイピング

上記で得られた 2 種のハイブリドーマ F B 6 M A 1 1 細胞株およびハイブリドーマ F B 6 M A 5 3 細胞株の培養上清 0. 5 m L を用いて Mouse Antibody Isotyping kit (Gibco BRL 社) を用いてアイソタイプを調べた。2 種のハイブリドーマ F B 6 M A 1 1 細胞株および F B 6 M A 5 3 細胞株が産生するモノクローナル抗体のアイソタイプは、両者とも H 鎖は I g G 1、L 鎖は  $\kappa$  であった。

(7) モノクローナル抗体の調製と精製

8 週齢の雌性 B a l b / c マウスに 0. 5 m l / 匹のプリスタンを経口投与し、その 10 日後に上記 d のクローニングで得られた 2 種のハイブリドーマ 2 B 2 - 6 細胞株および S 2 E 5 細胞株をそれぞれ 1 匹あたり約  $10^7$  細胞数 / 0. 5 m l / 匹で腹腔内に注入した。10 日後頃からマウスの腹部肥大を認めたため、18 G の注射針を用いて腹水を採取した。採取した腹水は、1, 000 r p m、4°C にて 10 分間遠心分離し、その上清を 37°C、30 分間放置した後、4°C で一晩静置した。12, 000 r p m、4°C で 10 分間遠心分離後、得られた上清をアフィニティーカラム Sepharose Protein A (Pharmacia biotech 社製) を用いて各モノクローナル抗体を精製した。この抗体溶液の 260、280、320 n m における吸光度を測定し、werbulg-christian 法により抗体濃度を測定した。

(8) ウェスタンブロッティング

組み換え h B S S P 6 タンパク質 (プロ体および成熟体)、トリプシノーゲン、そして、ヒトカリクレインを等量の 2×SDS loading buffer (第一化学社製) と混合したものをサンプル溶液とした。該サンプル溶液を SDS 電気泳動装置 (第一化学社製) およびトリス-グリシンバッファー (第一化学社製) を用いて



10-20%ポリアクリルアミドゲル（第一化学社製）で電気泳動した。

一方、泳動中、ブロット用に3MM濾紙（Whatman社製）をbuffer A（第一化学社製）に2枚、buffer B（第一化学社製）に1枚、buffer C（第一化学社製）に3枚浸した。またポリビニリデンジフルオライド膜（PVDF膜：Millipore社製）をメタノールに浸した後、精製水に浸し水になじませた。タンパク質のPVDF膜への転写は、電気泳動後ゲルを装置から取り出し、ブロッター（ファルマシア社製）に陽極側からbuffer Aに浸した2枚の濾紙、buffer Bに浸した1枚の濾紙、PVDF膜、ゲル、およびbuffer Cに浸した3枚の濾紙を記載の順に置き、8mVで1.5時間で行った。転写後、PVDF膜をブロックエース（雪印乳業社製）で室温で1時間振とうすることによりブロッキングした。その後、該膜を（7）で得られた精製抗体二種類を5%牛胎児血清添加PBSで希釈したものと4℃で一晩反応させた。その後、アルカリフォスファターゼ標識マウスIgG抗体を加え、室温で1時間反応後、NBT-BCIP溶液で発色させ、培養上清中組み換え体ヒトBSSP6タンパク質の発現を確認した（図10）。

#### 実施例6 ヒトBSSP6変異型のクローニング

ヒト前立腺癌細胞株PC-3より常法にしたがい、poly A+RNAを調製した。これをoligo dTをプライマーとしてSuperscript II（Gibco BRL）を用いて逆転写してcDNAを合成した。これを鋳型に、配列番号20および34をプライマーにPCR反応を行った。反応は95℃2分の後、95℃にて30秒、56℃にて30秒、72℃にて30秒を35サイクル行った。得られたPCR産物をTOPO TAクローニングキットを用いてクローニングし、シーケンスを行ったところ変異型hBSSP6の当該配列を見いだした。変異型hBSSP6をコードする塩基配列を配列番号5に、この塩基配列から推定される変異型hBSSP6タンパク質のアミノ酸配列を配列番号6に示す。なお配列番号5において、139位のアミノ酸Cysをコードする528～530位の塩基配列が「tgt」のものと「tgc」のものの2種類が存在した。従って、配列番号5の530位の塩基は、「tまたはc」を示す「y」によって表されている。配

列番号 20 と 25 を用いて変異型の全長を含む cDNA をクローン化し、プラスミド pCRII/hBSSP6 variant type を得た。

表 2

配列番号	プライマー名	向き	配 列	用途
20	hBSSP6F3	Forward	GGACTCAAGAGAGGAACCTG	全長用
34	hBSSP6R3	Reverse	ATGGTGTCTGTGATGTTGCC	一部用
25	hBSSP6R3/P	Reverse	AACTGCAGGAACCAAACACCAAGTGG	全長用

#### 実施例 7 RT-PCR による hBSSP6 mRNA の発現解析

Clontech 社より購入したヒト各種臓器の polyA+RNA を鋳型に Superscript II (Gibco BRL 社) を用いて oligo dT プライマーによって逆転写反応を行い、cDNA を得た。逆転写反応は Gibco BRL 社のマニュアルにしたがい、55℃ で行った。この cDNA を鋳型に活性体を増幅するプライマーを用いて、95℃ にて 30 秒、60℃ にて 30 秒、72℃ にて 30 秒を 35 サイクルの PCR 反応を行った。PCR 産物を 1% アガロースゲル電気泳動で解析したところ、成人海馬、唾液腺、甲状腺、乳腺、肺、前立腺、精巣で発現が認められた (図 11)。

#### 実施例 8 大腸菌による hBSSP6 変異型の発現

プラスミド pCRII/hBSSP6 variant type をテンプレートに、配列番号 21 と 25 をプライマーとして hBSSP6 変異型タンパク質成熟体タンパク質をコードする cDNA 領域を PCR 反応にて増幅した。この PCR 産物をそれぞれ pTrc-HisB (Invitrogen) を BamHI で消化後、マングビーン・ヌクレアーゼで平滑末端にしたものに常法通りにライゲーションし、大腸菌 DH5α を形質転換させ、生じたコロニーを PCR 法にて解析して目的とするセリンプロテアーゼ発現プラスミド pTrcHis/hBSSP6 variant type を含む大腸菌を得た。得られた大腸菌は、E. coli pTrcHis/hBSSP6 variant type と命名した。

発現プラスミドを持つ大腸菌のジングルコロニーを 10ml の LB (Amp

+) 培地に接種し、一晚 37℃ で培養した。これを 250 ml の LB (Amp  
+) 培地に接種し、37℃ で培養した。600 nm の吸光度が 0.5 になった時、  
250  $\mu$  l の 0.1 M IPTG (イソプロピルー  $\beta$ -D (-) チオガラクトピ  
ラノシド) を加え、更に 5 時間培養した。この大腸菌を遠心分離後、菌体破壊バ  
5 ップファー (10 mM リン酸バッファー pH 7.5、1 mM EDTA) で懸濁し、  
氷上で超音波処理を行うことで大腸菌を破壊し、14,000 rpm、4℃ で 2  
0 分遠心して沈殿を得た。この沈殿物を 0.5% Triton X-100 を含  
む菌体破壊バッファーで 2 度洗浄し、Triton X-100 を取り除くため  
に水洗した後に 8 M の尿素を含む変性バッファー (8 M 尿素、50 mM Tris  
10 pH 8.5、20 mM 2ME) で 37℃ で 1 時間浸透することで溶解した。  
この溶解液を TALON metal affinity resin (Clontech 社製) に通し、10 mM イ  
ミダゾール含有変性バッファーで洗浄後、100 mM イミダゾール含有変性バ  
ッファーで溶出し、精製した。この精製物を抗 hBSSP6 抗体で検出したところ、  
hBSSP6 よりも分子量の大きな変異型特異的なバンドが検出された (図 1  
15 2)。hBSSP6 変異型を、上記実施例 4 に記載の手順に従って、Sf-9 細  
胞を使用して発現させ、その酵素活性を調べることもできる。

表 3

配列番号	プライマー名	向き	配列	用途
21	hBSSP6F4	Forward	ATCATCAAGGGGTTTCGAGTG	一部用

20 実施例 9 RT-PCR とサザンハイブリダイゼーションによる変異型 hBSSP6 mRNA の検出

Clontech 社より購入したヒト各種臓器の poly A+RNA を鋳型に  
Superscript II (Gibco BRL 社) を用いて oligo dT プライマーによって逆  
転写反応を行い、cDNA を得た。逆転写反応は Gibco BRL 社のマニュアルにし  
たがい、55℃ で行った。この cDNA を鋳型に配列番号 20 および 35 をプラ  
25 イマーにして、95℃ にて 30 秒、60℃ にて 30 秒、72℃ にて 30 秒を 30  
サイクルの PCR 反応を行った。得られた PCR 産物を常法にしたがってナイロ

ンフィルター (Hybond N+, アマシャム・ファルマシア社) 上にブロットした。この際、pCRII/hBSSP6 variant type を制限酵素 EcoRI で切断したものをコントロールとして同時にブロットした。このメンブランフィルターに対して pCRII/hBSSP6 の全長をコードする部分を  $\alpha$ - $^{32}$ P dCTP で標識したプローブを  $5\times$ SSC で希釈したものと、65℃で一昼夜反応させた。その後、フィルターを  $2\times$ SSC/0.1%SDS で室温30分間、 $1\times$ SSC/0.1%SDS で室温30分間、 $0.1\times$ SSC/0.1%SDS で65℃30分間で2回洗い、FLA 2000用イメージングプレート (富士フイルム社) に1日露光させた。その結果、検討した前立腺癌細胞株 PC-3、DU145、LNCaP、およびヒトの精巣、肺、胎児脳、成人海馬においてその発現が認められた (図13)。

表4

配列番号	プライマー名	向き	配列	用途
35	hBSSP6F7	Forward	CCTCAAGCCGTGGGTGTCAC	一部用

#### 産業上の利用の可能性

本発明によって、単離されたヒトおよびマウスのセリンプロテアーゼ (hBSSP6 および mBSSP6) ポリヌクレオチド、それらの相同体、成熟体、前駆体および多形性変種が提供される。さらに、本発明によって、hBSSP6 および mBSSP6 タンパク質ならびに hBSSP6 および mBSSP6 ポリヌクレオチドおよびタンパク質を含有する組成物、それらの製造方法および使用が提供される。

配列表フリーテキスト

SEQ ID NO: 7: Designed oligonucleotide to construct plasmid pSecTrypHis

5 SEQ ID NO: 8: Designed oligonucleotide to construct plasmid pSecTrypHis

SEQ ID NO: 9: Designed oligonucleotide primer to amplify neurosin-encoding sequence

SEQ ID NO:10: Designed oligonucleotide primer to amplify neurosin-encoding sequence

10 SEQ ID NO:11: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pSecTrypHis/Neurosin

SEQ ID NO:12: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pSecTrypHis/Neurosin

15 SEQ ID NO:13: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pTrypHis

SEQ ID NO:14: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pTrypSigTag

SEQ ID NO:15: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pFBTrypSigTag

20 SEQ ID NO:16: Designed oligonucleotide primer to amplify active hBSSP6-encoding sequence

SEQ ID NO:17: Designed oligonucleotide primer to amplify active hBSSP6-encoding sequence

25 SEQ ID NO:18: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6F1 for RACE for human BSSP6 (forward)

SEQ ID NO:19: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6F2 for RACE for human BSSP6 (forward)

SEQ ID NO:20: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6F3 to amplify full-length human brain BSSP6-encoding mRNA

(forward)

SEQ ID NO:21: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6F4 to amplify mature human BSSP6-encoding region (forward)

5 SEQ ID NO:22: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6F5 to amplify full-length human prostate BSSP6-encoding mRNA (forward)

SEQ ID NO:23: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6R1 for RACE for human BSSP6 (reverse)

10 SEQ ID NO:24: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6R2 for RACE for human BSSP6 (reverse)

SEQ ID NO:25: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6R3/P to amplify full-length human BSSP6-encoding mRNA (reverse)

SEQ ID NO:26: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP6F1 for RACE for mouse BSSP6 (forward)

15 SEQ ID NO:27: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP6F2 for RACE for mouse BSSP6 (forward)

SEQ ID NO:28: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP6F3 to amplify full-length mouse prostate BSSP6-encoding mRNA (forward)

20 SEQ ID NO:29: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP6F4 to amplify mature mouse BSSP6-encoding region (forward)

SEQ ID NO:30: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP6F5 to amplify full-length mouse brain BSSP6-encoding mRNA (forward)

25 SEQ ID NO:31: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP6R1 for RACE for mouse BSSP6 (reverse)

SEQ ID NO:32: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP6R2 for RACE for mouse BSSP6 (reverse)

SEQ ID NO:33: Designed oligonucleotide primer designated as

mBSSP6R3/E to amplify full-length mouse BSSP6-encoding mRNA (reverse)

SEQ ID NO:34: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6R3 to amplify a portion of BSSP6 variant type-encoding mRNA from human prostatic cancer cell line PC-3 (reverse)

5 SEQ ID NO:35: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6F7 to amplify a portion of human BSSP6-encoding mRNA (forward)

SEQ ID NO:36: Designed oligonucleotide primer to amplify conserved region of serin proteases-encoding sequence; n is a, c, g or t.

10 SEQ ID NO:37: Designed oligonucleotide primer to amplify conserved region of serin proteases-encoding sequence; n is a, c, g or t.

## 請 求 の 範 囲

1. 配列番号2のアミノ酸番号1～229に示すアミノ酸229個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号2のアミノ酸番号1～229に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸番号1～229に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはその修飾体。

2. 配列番号1の塩基番号272～958に示す塩基配列、配列番号2のアミノ酸番号1～229に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、またはこれらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号2のアミノ酸番号1～229に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

3. 配列番号4のアミノ酸番号1～229に示すアミノ酸229個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号4のアミノ酸番号1～229に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号4のアミノ酸番号1～229に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはその修飾体。

4. 配列番号3の塩基番号244～930に示す塩基配列、配列番号4のアミノ酸番号1～229に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、またはこれらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号4のアミノ酸番号1～229に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

5. 配列番号2のアミノ酸番号-53～229に示すアミノ酸282個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号2のアミノ酸番号-53～229に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸番号-53～229に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、



配列番号4のアミノ酸番号ー47  
は数個のアミノ酸が欠失、置換も  
配列番号4のアミノ酸番号ー47  
質と同等の性質を有するタンパク

示す塩基配列、配列番号4のアミ  
コードする塩基配列、またはこれ  
下でハイブリダイズし、かつ配  
アミノ酸配列を有するタンパク質  
塩基配列。

示すアミノ酸254個から成るア  
番号6のアミノ酸番号1～254  
アミノ酸が欠失、置換もしくは付  
のアミノ酸番号1～254に示  
質を有するタンパク質、あるいは

示す塩基配列、配列番号6のアミ  
コードする塩基配列、またはこれらに  
でハイブリダイズし、かつ配列番  
配列を有するタンパク質と同等の

示すアミノ酸275個から成  
配列番号6のアミノ酸番号ー21  
は数個のアミノ酸が欠失、置換も  
配列番号6のアミノ酸番号ー21  
質と同等の性質を有するタンパク

示す塩基配列、配列番号6のアミ  
コードする塩基配列、またはこれら

5

10

15

20

25

るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号4のアミノ酸番号ー47  
～229に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換も  
しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号4のアミノ酸番号ー47  
～229に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク  
5 質、あるいはその修飾体。

12. 配列番号3の塩基番号103～930に示す塩基配列、配列番号4のアミ  
ノ酸番号ー47～229に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、またはこれ  
らに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配  
列番号4のアミノ酸番号ー47～229に示すアミノ酸配列を有するタンパク質  
10 と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

13. 配列番号6のアミノ酸番号1～254に示すアミノ酸254個から成るア  
ミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号6のアミノ酸番号1～254  
に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付  
加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号6のアミノ酸番号1～254に示  
15 すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいは  
その修飾体。

14. 配列番号5の塩基番号114～875に示す塩基配列、配列番号6のアミ  
ノ酸番号1～254に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、またはこれらに  
相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番  
20 号6のアミノ酸番号1～254に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の  
性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

15. 配列番号6のアミノ酸番号ー21～254に示すアミノ酸275個から成  
るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号6のアミノ酸番号ー21  
～254に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換も  
しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号6のアミノ酸番号ー21  
25 ～254に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク  
質、あるいはその修飾体。

16. 配列番号5の塩基番号51～875に示す塩基配列、配列番号6のアミ  
ノ酸番号ー21～254に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、またはこれら

に相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号6のアミノ酸番号ー21～254に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

5 17. 配列番号1に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、配列番号1に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

18. 配列番号3に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、配列番号3に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

10 19. 配列番号5に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、配列番号5に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

20. 請求項2、4、6、8、10、12、14、16～19のいずれか1つに記載の塩基配列を含むことを特徴とするベクター。

15 21. 請求項2、4、6、8、10、12、14、16～19のいずれか1つに記載の塩基配列を発現可能に保持する形質転換細胞。

22. 請求項2、6、8または17のいずれか1つに記載の塩基配列で形質転換した細胞を培養し、産生されたhBSSP6を採取することを特徴とするタンパク質の製造法。

20 23. 請求項4、10、12または18のいずれか1つに記載の塩基配列で形質転換した細胞を培養し、産生されたmBSSP6を採取することを特徴とするタンパク質の製造法。

25 24. 請求項14、16または19に記載の塩基配列で形質転換した細胞を培養し、産生された変異型hBSSP6を採取することを特徴とするタンパク質の製造法。

25. 細胞が大腸菌、動物細胞または昆虫細胞である、請求項22～24のいずれか1つに記載の製造法。

26. BSSP6遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物。

27. BSSP6遺伝子がBSSP6をコードするcDNA、ゲノムDNAまたは合成DNAである請求項26記載のトランスジェニック非ヒト動物。

28. 遺伝子発現調節部位に変異を起こさせることにより発現レベルを変化させた請求項26記載のトランスジェニック非ヒト動物。

5 29. BSSP6遺伝子の機能を欠損させたノックアウトマウス。

30. 請求項1、3、5、7、9、11、13または15のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片に対する抗体。

31. ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体またはペプチド抗体である請求項30記載の抗体。

10 32. ヒト以外の温血動物に請求項1、3、5、7、9、11、13または15のいずれか1つに記載のタンパク質もしくははその断片を投与し、抗体価の認められる該動物を選択し、脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することを含む、請求項1、3、5、7、9、11、13または15  
15 5のいずれか1つに記載のタンパク質もしくははその断片に対するモノクローナル抗体の製造方法。

33. 請求項1、3、5、7、9、11、13または15のいずれか1つに記載のタンパク質もしくははその断片に対する抗体と検体中の該タンパク質もしくははその断片との免疫学的な結合に基づいて、検体中の該タンパク質もしくははその断片  
20 を測定する方法。

34. 請求項1、5、7、13または15のいずれか1つに記載のタンパク質もしくははその断片に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体と標識化抗体とにより、検体中のBSSP6もしくははその断片を反応させ、生成したサンドイッチ錯体を検出する、検体中のBSSP6もしくははその断片を測定する方法。

25 35. 請求項1、5、7、13または15に記載のタンパク質もしくははその断片に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体に対して、標識化BSSP6と検体中のBSSP6もしくははその断片とを競合的に反応させ、抗体と反応した標識化BSSP6の量から検体中のBSSP6もしくははその断片の量を検出する、検体中のBSSP6もしくははその断片を測定する方法。

36. 検体が体液である、請求項33～35のいずれか1つに記載の方法。

37. 請求項1、3、5、7、9、11、13または15のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片を含む、組織における疾患の診断マーカー。

5 38. 脳における、アルツハイマー病、てんかんの診断に用いる請求項37記載のマーカー。

39. 脳、髄質、前立腺、胎盤、心臓、精巣または肺における、癌、炎症の診断に用いる請求項37記載のマーカー。

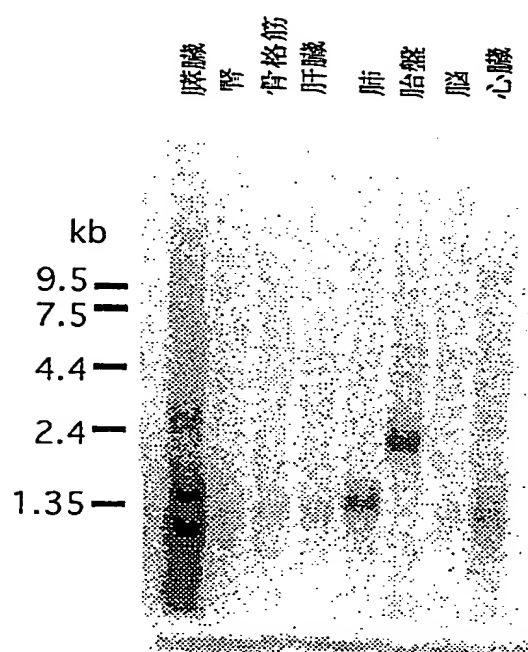
40. 精液または精子における、不妊症の診断に用いる請求項37記載のマーカー。

10 41. 前立腺における、前立腺肥大症の診断に用いる請求項37記載のマーカー。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図 1

hBSSP-6



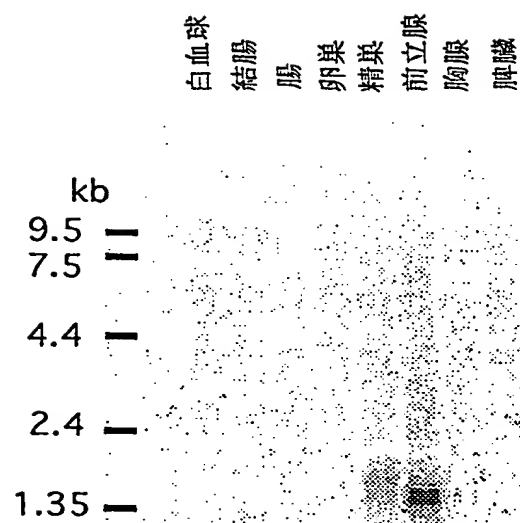
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



2/13

図 2

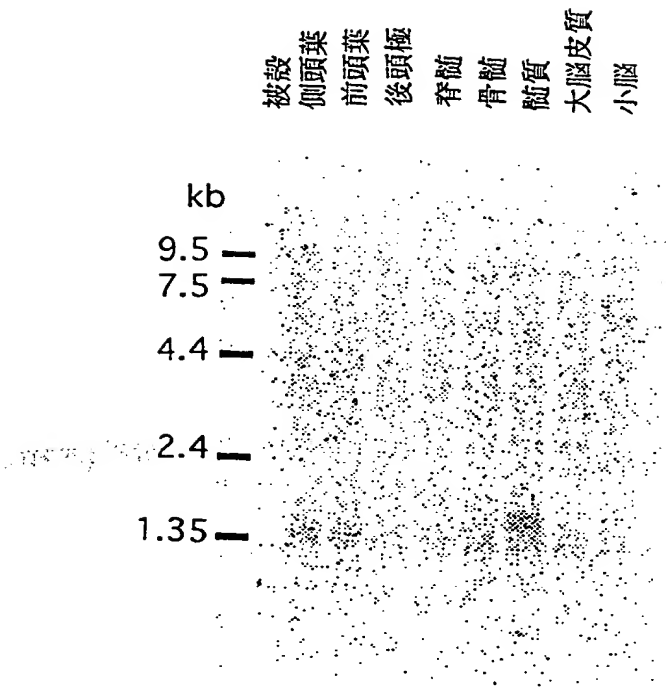
hBSSP-6



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図 3

hBSSP-6

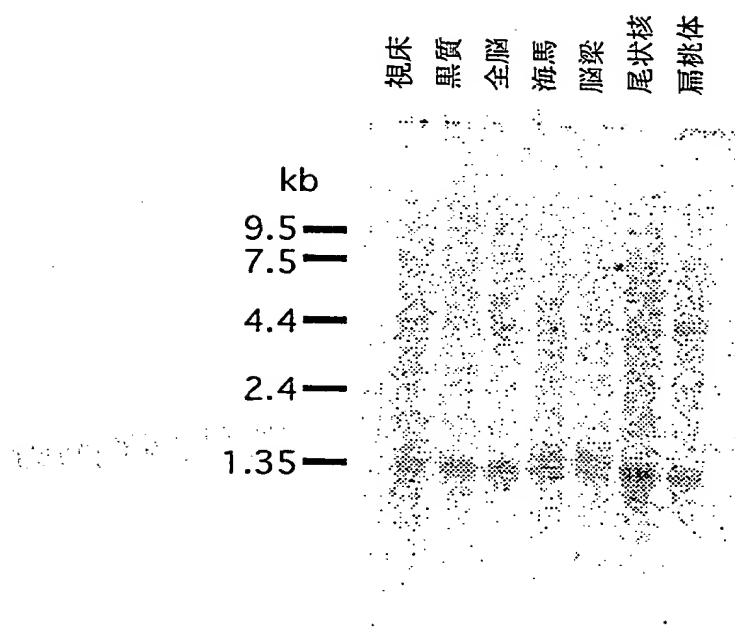


**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

4/13

図 4

hBSSP-6

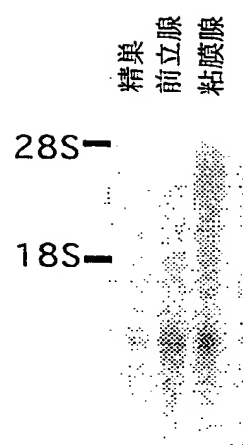


**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

5/13

図 5

hBSSP-6

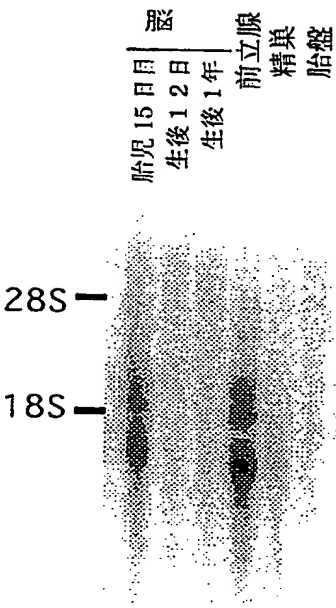


**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



図 6

mBSSP-6

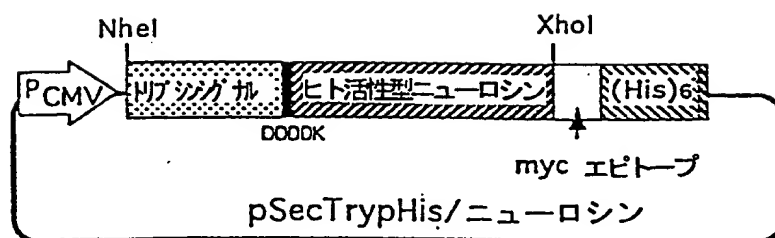




**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

7 / 13

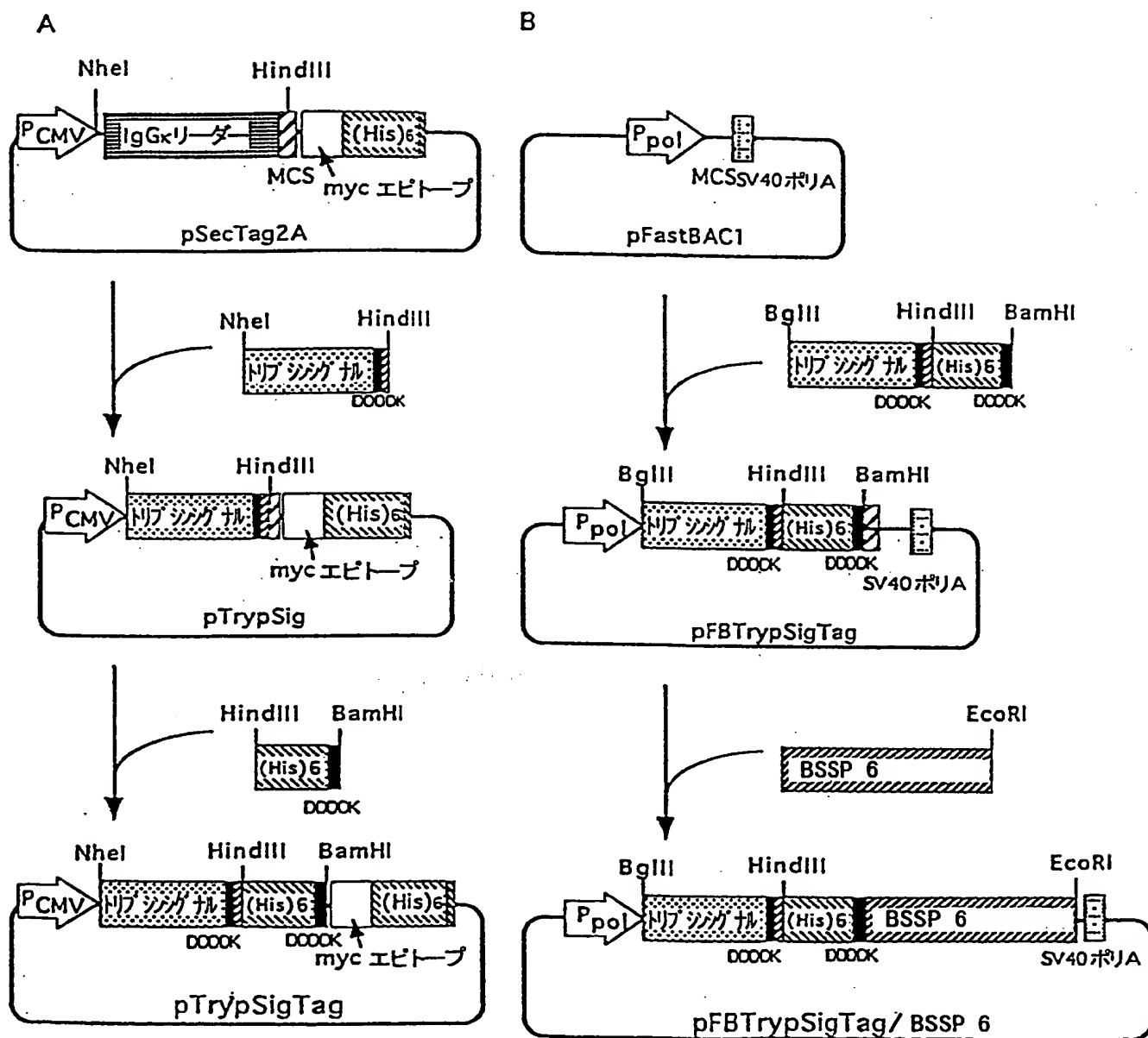
図 7



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

8 / 13

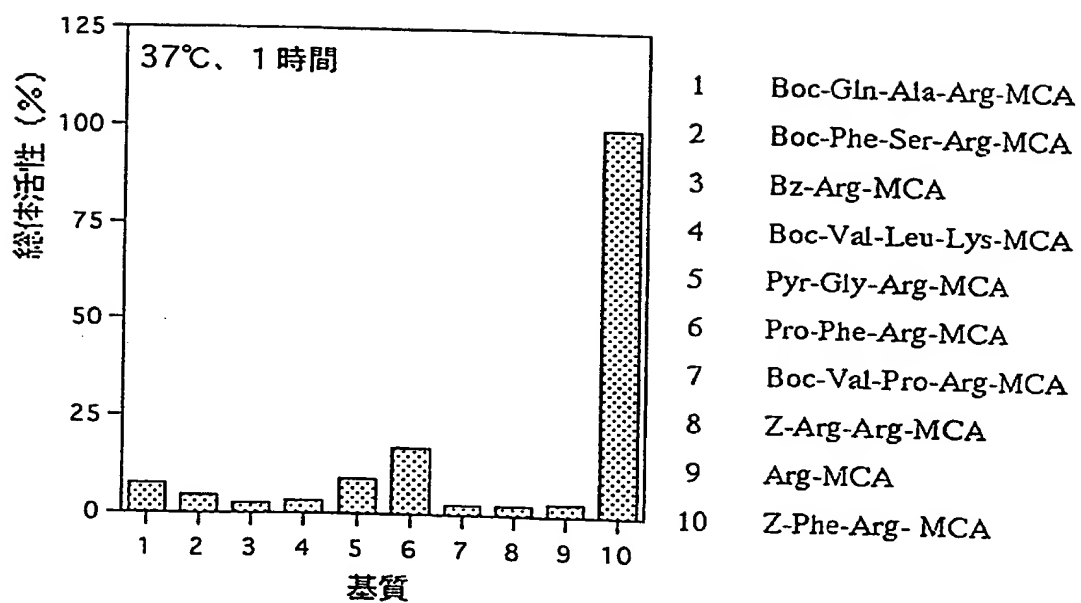
図 8



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

9/13

図 9



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



図 10

α-FB6MA11      α-FB6MA53

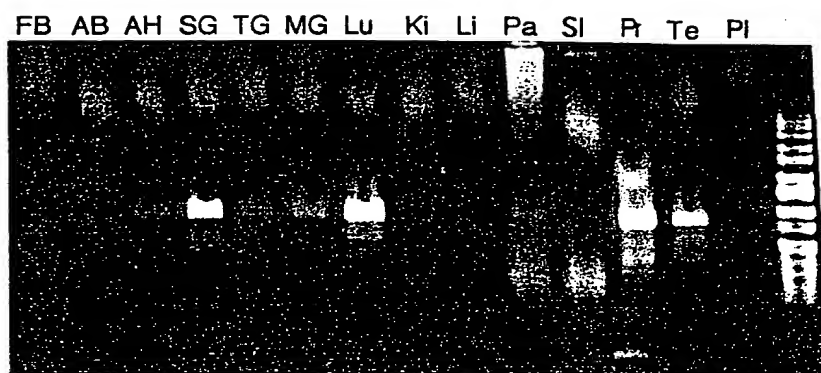
1 2 3 4 M    1 2 3 4

- 1. 組換え体 BSSP6(プロ体)
- 2. 組換え体 BSSP6(成熟体)
- 3. トリプシノーゲン
- 4. カリクレイン

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

11/13

☒ 1 1

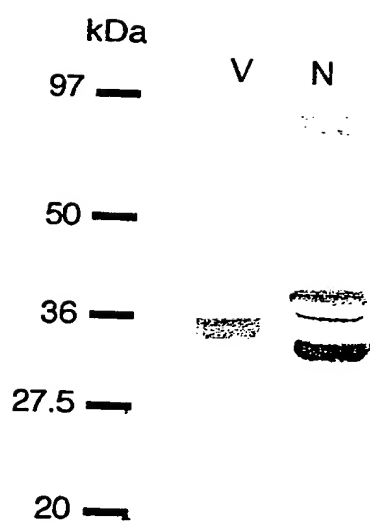


FB; 胎児脳  
 AB; 成人脳  
 AH; 成人海馬  
 SG; 唾液腺  
 TG; 甲状腺  
 MG; 乳腺  
 Lu; 肺  
 Ki; 腎  
 Li; 肝  
 Pa; 脾  
 SI; 小腸  
 Pr; 前立腺  
 Te; 精巣  
 PI; 胎盤

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

12/13

図 1 2



V; 変異型hBSSP6

N; 正常hBSSP6

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

13/13

図 13

プラスミド PC DU LN Te Lu FB AH



PC; PC-3

DU; DU145

LN; LNCaP

Te; 精巣

Lu; 肺

FB; 胎児脳

AH; 成人海馬

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## SEQUENCE LISTING

<110> Fuso Pharmaceutical Industries Ltd.

<120> Novel serine protease BSSP6

<130> 661641

<150> JP 10-347802

<151> 1998-11-20

<160> 39

<210> 1

<211> 1301

<212> DNA

<213> human

<400> 1

```

ctgccttgct ccacacctgg tcaggggaga gaggggagga aagccaaggg aaggggaccta      60
actgaaaaca aacaagctgg gagaagcagg aatctgcgct cgggttccg                    109
cag atg cag agg ttg agg tgg ctg cgg gac tgg aag tca tcg ggc aga ggt 160
      Met Gln Arg Leu Arg Trp Leu Arg Asp Trp Lys Ser Ser Gly Arg Gly
              -50                      -45                      -40
ctc aca gca gcc aag gaa cct ggg gcc cgc tcc tcc ccc ctc cag gcc atg 211
Leu Thr Ala Ala Lys Glu Pro Gly Ala Arg Ser Ser Pro Leu Gln Ala Met
              -35                      -30                      -25
agg att ctg cag tta atc ctg ctt gct ctg gca aca ggg ctt gta ggg gga 262
Arg Ile Leu Gln Leu Ile Leu Leu Ala Leu Ala Thr Gly Leu Val Gly Gly
-20                      -15                      -10                      -5
gag acc agg atc atc aag ggg ttc gag tgc aag cct cac tcc cag ccc tgg 313
Glu Thr Arg Ile Ile Lys Gly Phe Glu Cys Lys Pro His Ser Gln Pro Trp

```

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

2/24

-1	1	5	10	
cag gca gcc ctg ttc gag aag acg cgg cta ctc tgt ggg gcg acg ctc atc	364			
Gln Ala Ala Leu Phe Glu Lys Thr Arg Leu Leu Cys Gly Ala Thr Leu Ile				
15	20	25	30	
gcc ccc aga tgg ctc ctg aca gca gcc cac tgc ctc aag ccc cgc tac ata	415			
Ala Pro Arg Trp Leu Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Lys Pro Arg Tyr Ile				
35	40	45		
gtt cac ctg ggg cag cac aac ctc cag aag gag gag ggc tgt gag cag acc	466			
Val His Leu Gly Gln His Asn Leu Gln Lys Glu Glu Gly Cys Glu Gln Thr				
50	55	60	65	
cgg aca gcc act gag tcc ttc ccc cac ccc ggc ttc aac aac agc ctc ccc	517			
Arg Thr Ala Thr Glu Ser Phe Pro His Pro Gly Phe Asn Asn Ser Leu Pro				
70	75	80		
aac aaa gac cac cgc aat gac atc atg ctg gtg aag atg gca tcg cca gtc	568			
Asn Lys Asp His Arg Asn Asp Ile Met Leu Val Lys Met Ala Ser Pro Val				
85	90	95		
tcc atc acc tgg gct gtg cga ccc ctc acc ctc tcc tca cgc tgt gtc act	619			
Ser Ile Thr Trp Ala Val Arg Pro Leu Thr Leu Ser Ser Arg Cys Val Thr				
100	105	110	115	
gct ggc acc agc tgc ctc att tcc ggc tgg ggc agc acg tcc agc ccc cag	670			
Ala Gly Thr Ser Cys Leu Ile Ser Gly Trp Gly Ser Thr Ser Ser Pro Gln				
120	125	130		
tta cgc ctg cct cac acc ttg cga tgc gcc aac atc acc atc att gag cac	721			
Leu Arg Leu Pro His Thr Leu Arg Cys Ala Asn Ile Thr Ile Ile Glu His				
135	140	145	150	
cag aag tgt gag aac gcc tac ccc ggc aac atc aca gac acc atg gtg tgt	772			
Gln Lys Cys Glu Asn Ala Tyr Pro Gly Asn Ile Thr Asp Thr Met Val Cys				
155	160	165		
gcc agc gtg cag gaa ggg ggc aag gac tcc tgc cag ggt gac tcc ggg ggc	823			

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

3/24

Ala Ser Val Gln Glu Gly Gly Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly  
 170 175 180  
 cct ctg gtc tgt aac cag tct ctt caa ggc att atc tcc tgg ggc cag gat 874  
 Pro Leu Val Cys Asn Gln Ser Leu Gln Gly Ile Ile Ser Trp Gly Gln Asp  
 185 190 195 200  
 ccg tgt gcg atc acc cga aag cct ggt gtc tac acg aaa gtc tgc aaa tat 925  
 Pro Cys Ala Ile Thr Arg Lys Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Cys Lys Tyr  
 205 210 215  
 gtg gac tgg atc cag gag acg atg aag aac aat tagactggac ccacccacca 978  
 Val Asp Trp Ile Gln Glu Thr Met Lys Asn Asn  
 220 225  
 cagcccatca ccctccattt ccacttggtg tttggttcct gttcactctg ttaataagaa 1038  
 accctaagcc aagaccctct acgaacattc tttgggcctc ctggactaca ggagatgctg 1098  
 tcacttaata atcaacctgg gggttcgaaat cagtgaagacc tggattcaaa ttctgccttg 1158  
 aaatattgtg actctgggaa tgacaacacc tggtttggtt tctgttgat cccagcccc 1218  
 aaagacagct cctggccata tatcaagggt tcaataaata ttgctaaat gaaaaaaaaa 1278  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 1301

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 282

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 2

Met Gln Arg Leu Arg Trp Leu Arg Asp Trp Lys Ser Ser Gly Arg Gly  
 -50 -45 -40  
 Leu Thr Ala Ala Lys Glu Pro Gly Ala Arg Ser Ser Pro Leu Gln Ala Met  
 -35 -30 -25  
 Arg Ile Leu Gln Leu Ile Leu Leu Ala Leu Ala Thr Gly Leu Val Gly Gly

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

4/24

-20                      -15                      -10                      -5  
 Glu Thr Arg Ile Ile Lys Gly Phe Glu Cys Lys Pro His Ser Gln Pro Trp  
                     -1      1                      5                      10  
 Gln Ala Ala Leu Phe Glu Lys Thr Arg Leu Leu Cys Gly Ala Thr Leu Ile  
     15                      20                      25                      30  
 Ala Pro Arg Trp Leu Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Lys Pro Arg Tyr Ile  
                     35                      40                      45  
 Val His Leu Gly Gln His Asn Leu Gln Lys Glu Glu Gly Cys Glu Gln Thr  
                     50                      55                      60                      65  
 Arg Thr Ala Thr Glu Ser Phe Pro His Pro Gly Phe Asn Asn Ser Leu Pro  
                     70                      75                      80  
 Asn Lys Asp His Arg Asn Asp Ile Met Leu Val Lys Met Ala Ser Pro Val  
                     85                      90                      95  
 Ser Ile Thr Trp Ala Val Arg Pro Leu Thr Leu Ser Ser Arg Cys Val Thr  
     100                      105                      110                      115  
 Ala Gly Thr Ser Cys Leu Ile Ser Gly Trp Gly Ser Thr Ser Ser Pro Gln  
                     120                      125                      130  
 Leu Arg Leu Pro His Thr Leu Arg Cys Ala Asn Ile Thr Ile Ile Glu His  
                     135                      140                      145                      150  
 Gln Lys Cys Glu Asn Ala Tyr Pro Gly Asn Ile Thr Asp Thr Met Val Cys  
                     155                      160                      165  
 Ala Ser Val Gln Glu Gly Gly Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly  
                     170                      175                      180  
 Pro Leu Val Cys Asn Gln Ser Leu Gln Gly Ile Ile Ser Trp Gly Gln Asp  
     185                      190                      195                      200  
 Pro Cys Ala Ile Thr Arg Lys Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Cys Lys Tyr  
                     205                      210                      215  
 Val Asp Trp Ile Gln Glu Thr Met Lys Asn Asn  
     220                      225

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



5/24

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1323

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; mouse

&lt;400&gt; 3

ccacatctga ctagggaagt aaggcgaagg aggcccatgg aagaaaaatc taaatgaaaa 60

cataagctag gagaactgag gcttcaaacc tgaagctatc ta atg agg agg ctg aag 117

Met Arg Arg Leu Lys

-45

agt gac tgg aaa tta tct aca gaa acc agg gaa cct ggc gcc cgc cct gcc 168

Ser Asp Trp Lys Leu Ser Thr Glu Thr Arg Glu Pro Gly Ala Arg Pro Ala

-40

-35

-30

cta ctc cag gcc agg atg att ctc cga ctc att gca ctt gct ctg gta aca 219

Leu Leu Gln Ala Arg Met Ile Leu Arg Leu Ile Ala Leu Ala Leu Val Thr

-25

-20

-15

-10

ggg cac gta ggg gga gag acg agg atc atc aag ggt tat gag tgc agg cct 270

Gly His Val Gly Gly Glu Thr Arg Ile Ile Lys Gly Tyr Glu Cys Arg Pro

-5

-1 1

5

cac tca cag cca tgg cag gtg gcc ctc ttt cag aag aca cgg ctt ctc tgt 321

His Ser Gln Pro Trp Gln Val Ala Leu Phe Gln Lys Thr Arg Leu Leu Cys

10

15

20

25

ggg gca acc ctc atc gcc ccc aaa tgg ctc ctg aca gca gcc cac tgc cgc 372

Gly Ala Thr Leu Ile Ala Pro Lys Trp Leu Leu Thr Ala Ala His Cys Arg

30

35

40

aag ccc cat tac gtg atc ctc ctt gga gag cac aat cta gag aag aca gac 423

Lys Pro His Tyr Val Ile Leu Leu Gly Glu His Asn Leu Glu Lys Thr Asp

45

50

55

60

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

6/24

```

ggc tgt gag cag agg cgg atg gcc act gag tcc ttc ccc cac ccc gac ttc 474
Gly Cys Glu Gln Arg Arg Met Ala Thr Glu Ser Phe Pro His Pro Asp Phe
          65              70              75
aac aac agc ctc ccc aac aaa gac cac cgg aat gac ata atg ctt gtg aag 525
Asn Asn Ser Leu Pro Asn Lys Asp His Arg Asn Asp Ile Met Leu Val Lys
          80              85              90
atg tcg tct ccc gtc ttc ttt acc cga gct gtg cag cca ctc acc ctg tcc 576
Met Ser Ser Pro Val Phe Phe Thr Arg Ala Val Gln Pro Leu Thr Leu Ser
          95              100             105             110
cca cac tgt gtc gct gca ggc acc agc tgc ctc att tct gga tgg ggc acc 627
Pro His Cys Val Ala Ala Gly Thr Ser Cys Leu Ile Ser Gly Trp Gly Thr
          115             120             125
acg tcc agc ccc cag ttg cgc ctg cct cat tcc ttg cga tgt gcc aat gtc 678
Thr Ser Ser Pro Gln Leu Arg Leu Pro His Ser Leu Arg Cys Ala Asn Val
          130             135             140             145
tcc atc atc gaa cac aag gag tgt gag aag gcc tac ccg ggc aac atc aca 729
Ser Ile Ile Glu His Lys Glu Cys Glu Lys Ala Tyr Pro Gly Asn Ile Thr
          150             155             160
gac acc atg ctg tgc gcc agt gtt cgg aaa gag ggc aag gac tcc tgt cag 780
Asp Thr Met Leu Cys Ala Ser Val Arg Lys Glu Gly Lys Asp Ser Cys Gln
          165             170             175
ggc gac tct gga ggc ccc ctg gtc tgc aac gga tct ctt caa ggc atc atc 831
Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asn Gly Ser Leu Gln Gly Ile Ile
          180             185             190             195
tcc tgg ggt cag gac cca tgt gcc gtc acc aga aag cct ggt gtc tat aca 882
Ser Trp Gly Gln Asp Pro Cys Ala Val Thr Arg Lys Pro Gly Val Tyr Thr
          200             205             210
aaa gtc tgc aaa tac ttt aac tgg atc cac gag gtt atg agg aac aat 930
Lys Val Cys Lys Tyr Phe Asn Trp Ile His Glu Val Met Arg Asn Asn

```

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

7/24

215                      220                      225  
 tagaggggac ctgcttccca ccaccaacc cctccaacct cttcttaatg ctttgacttc 990  
 tcttcattct gccctaagaa gtcctcagct gggaccctgg catgtactct ctccgaccca 1050  
 ccatgagtat agtataggga tgctctaact tgatgatcga cctggggcct ggaatcaaat 1110  
 cctgacttga actaaattgt gactctggac atgatcacca ctggttttgt ttgtttggtt 1170  
 gttttttgtt ttgtttgtt ttgttccag cttigaagac agtccctggc atatcccagg 1230  
 gtttcaataa atatttgta aatgataaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1290  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 1323

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 276

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; mouse

&lt;400&gt; 4

Met Arg Arg Leu Lys

-45

Ser Asp Trp Lys Leu Ser Thr Glu Thr Arg Glu Pro Gly Ala Arg Pro Ala  
 -40                      -35                      -30

Leu Leu Gln Ala Arg Met Ile Leu Arg Leu Ile Ala Leu Ala Leu Val Thr  
 -25                      -20                      -15                      -10

Gly His Val Gly Gly Glu Thr Arg Ile Ile Lys Gly Tyr Glu Cys Arg Pro  
 -5                      -1      1                      5

His Ser Gln Pro Trp Gln Val Ala Leu Phe Gln Lys Thr Arg Leu Leu Cys  
 10                      15                      20                      25

Gly Ala Thr Leu Ile Ala Pro Lys Trp Leu Leu Thr Ala Ala His Cys Arg  
 30                      35                      40

Lys Pro His Tyr Val Ile Leu Leu Gly Glu His Asn Leu Glu Lys Thr Asp  
 45                      50                      55                      60

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

8/24

Gly Cys Glu Gln Arg Arg Met Ala Thr Glu Ser Phe Pro His Pro Asp Phe  
                                 65                                70                                75  
 Asn Asn Ser Leu Pro Asn Lys Asp His Arg Asn Asp Ile Met Leu Val Lys  
                                 80                                85                                90  
 Met Ser Ser Pro Val Phe Phe Thr Arg Ala Val Gln Pro Leu Thr Leu Ser  
                                 95                                100                                105                                110  
 Pro His Cys Val Ala Ala Gly Thr Ser Cys Leu Ile Ser Gly Trp Gly Thr  
                                 115                                120                                125  
 Thr Ser Ser Pro Gln Leu Arg Leu Pro His Ser Leu Arg Cys Ala Asn Val  
                                 130                                135                                140                                145  
 Ser Ile Ile Glu His Lys Glu Cys Glu Lys Ala Tyr Pro Gly Asn Ile Thr  
                                 150                                155                                160  
 Asp Thr Met Leu Cys Ala Ser Val Arg Lys Glu Gly Lys Asp Ser Cys Gln  
                                 165                                170                                175  
 Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asn Gly Ser Leu Gln Gly Ile Ile  
                                 180                                185                                190                                195  
 Ser Trp Gly Gln Asp Pro Cys Ala Val Thr Arg Lys Pro Gly Val Tyr Thr  
                                 200                                205                                210  
 Lys Val Cys Lys Tyr Phe Asn Trp Ile His Glu Val Met Arg Asn Asn  
                                 215                                220                                225

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 934

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 5

actgggactc aagagaggaa cctggggccc gctcctcccc cctccaggcc

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



9/24

atg agg att ctg cag tta atc ctg ctt gct ctg gca aca ggg ctt gta ggg 101  
 Met Arg Ile Leu Gln Leu Ile Leu Leu Ala Leu Ala Thr Gly Leu Val Gly  
           -20                    -15                    -10                    -5  
 gga gag acc agg atc atc aag ggg ttc gag tgc aag cct cac tcc cag ccc 152  
 Gly Glu Thr Arg Ile Ile Lys Gly Phe Glu Cys Lys Pro His Ser Gln Pro  
                     -1    1                            5                            10  
 tgg cag gca gcc ctg ttc gag aag acg cgg cta ctc tgt ggg gcg acg ctc 203  
 Trp Gln Ala Ala Leu Phe Glu Lys Thr Arg Leu Leu Cys Gly Ala Thr Leu  
           15                            20                            25                            30  
 atc gcc ccc aga tgg ctc ctg aca gca gcc cac tgc ctc aag ccg tgg gtg 254  
 Ile Ala Pro Arg Trp Leu Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Lys Pro Trp Val  
                             35                            40                            45  
 tca ctc acc tct ccc acc cat gtc tcc ccc gac ctt tcc tcc tcc aac tac 305  
 Ser Leu Thr Ser Pro Thr His Val Ser Pro Asp Leu Ser Ser Ser Asn Tyr  
           50                            55                            60  
 tgt ctc tcc cac ctc agc cgc tac ata gtt cac ctg ggg cag cac aac ctc 356  
 Cys Leu Ser His Leu Ser Arg Tyr Ile Val His Leu Gly Gln His Asn Leu  
           65                            70                            75                            80  
 cag aag gag gag ggc tgt gag cag acc cgg aca gcc act gag tcc ttc ccc 407  
 Gln Lys Glu Glu Gly Cys Glu Gln Thr Arg Thr Ala Thr Glu Ser Phe Pro  
                             85                            90                            95  
 cac ccc ggc ttc aac aac agc ctc ccc aac aaa gac cac cgc aat gac atc 458  
 His Pro Gly Phe Asn Asn Ser Leu Pro Asn Lys Asp His Arg Asn Asp Ile  
           100                            105                            110                            115  
 atg ctg gtg aag atg gca tcg cca gtc tcc atc acc tgg gct gtg cga ccc 509  
 Met Leu Val Lys Met Ala Ser Pro Val Ser Ile Thr Trp Ala Val Arg Pro  
                             120                            125                            130  
 ctc acc ctc tcc tca cgc tgy gtc act gct ggc acc agc tgc ctc att tcc 560  
 Leu Thr Leu Ser Ser Arg Cys Val Thr Ala Gly Thr Ser Cys Leu Ile Ser

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

10/24

135	140	145	
ggc tgg ggc agc acg tcc agc ccc cag tta cgc ctg cct cac acc ttg cga	611		
Gly Trp Gly Ser Thr Ser Ser Pro Gln Leu Arg Leu Pro His Thr Leu Arg			
150	155	160	165
tgc gcc aac atc acc atc att gag cac cag aag tgt gag aac gcc tac ccc	662		
Cys Ala Asn Ile Thr Ile Ile Glu His Gln Lys Cys Glu Asn Ala Tyr Pro			
170	175	180	
ggc aac atc aca gac acc atg gtg tgt gcc agc gtg cag gaa ggg ggc aag	713		
Gly Asn Ile Thr Asp Thr Met Val Cys Ala Ser Val Gln Glu Gly Gly Lys			
185	190	195	200
gac tcc tgc cag ggt gac tcc ggg ggc cct ctg gtc tgt aac cag tct ctt	764		
Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asn Gln Ser Leu			
205	210	215	
caa ggc att atc tcc tgg ggc cag gat ccg tgt gcg atc acc cga aag cct	815		
Gln Gly Ile Ile Ser Trp Gly Gln Asp Pro Cys Ala Ile Thr Arg Lys Pro			
220	225	230	
ggt gtc tac acg aaa gtc tgc aaa tat gtg gac tgg atc cag gag acg atg	866		
Gly Val Tyr Thr Lys Val Cys Lys Tyr Val Asp Trp Ile Gln Glu Thr Met			
235	240	245	250
aag aac aat tagactggac ccacccacca cagcccatca ccctccattt ccacttggtg	925		
Lys Asn Asn			
tttggttcc			934

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 275

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; human

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

11/24

&lt;400&gt; 6

Met	Arg	Ile	Leu	Gln	Leu	Ile	Leu	Leu	Ala	Leu	Ala	Thr	Gly	Leu	Val	Gly
-20					-15					-10					-5	
Gly	Glu	Thr	Arg	Ile	Ile	Lys	Gly	Phe	Glu	Cys	Lys	Pro	His	Ser	Gln	Pro
		-1	1				5						10			
Trp	Gln	Ala	Ala	Leu	Phe	Glu	Lys	Thr	Arg	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Thr	Leu
15					20					25						30
Ile	Ala	Pro	Arg	Trp	Leu	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Lys	Pro	Trp	Val
				35				40						45		
Ser	Leu	Thr	Ser	Pro	Thr	His	Val	Ser	Pro	Asp	Leu	Ser	Ser	Ser	Asn	Tyr
	50					55					60					
Cys	Leu	Ser	His	Leu	Ser	Arg	Tyr	Ile	Val	His	Leu	Gly	Gln	His	Asn	Leu
65				70					75						80	
Gln	Lys	Glu	Glu	Gly	Cys	Glu	Gln	Thr	Arg	Thr	Ala	Thr	Glu	Ser	Phe	Pro
		85					90						95			
His	Pro	Gly	Phe	Asn	Asn	Ser	Leu	Pro	Asn	Lys	Asp	His	Arg	Asn	Asp	Ile
	100					105					110				115	
Met	Leu	Val	Lys	Met	Ala	Ser	Pro	Val	Ser	Ile	Thr	Trp	Ala	Val	Arg	Pro
			120							125				130		
Leu	Thr	Leu	Ser	Ser	Arg	Cys	Val	Thr	Ala	Gly	Thr	Ser	Cys	Leu	Ile	Ser
	135					140						145				
Gly	Trp	Gly	Ser	Thr	Ser	Ser	Pro	Gln	Leu	Arg	Leu	Pro	His	Thr	Leu	Arg
150					155					160					165	
Cys	Ala	Asn	Ile	Thr	Ile	Ile	Glu	His	Gln	Lys	Cys	Glu	Asn	Ala	Tyr	Pro
		170						175					180			
Gly	Asn	Ile	Thr	Asp	Thr	Met	Val	Cys	Ala	Ser	Val	Gln	Glu	Gly	Gly	Lys
	185					190					195				200	
Asp	Ser	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Val	Cys	Asn	Gln	Ser	Leu
			205					210						215		

**THIS PAGE BLANK (USP)**

12/24

Gln Gly Ile Ile Ser Trp Gly Gln Asp Pro Cys Ala Ile Thr Arg Lys Pro  
220 225 230  
Gly Val Tyr Thr Lys Val Cys Lys Tyr Val Asp Trp Ile Gln Glu Thr Met  
235 240 245 250  
Lys Asn Asn

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 99

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed oligonucleotide to construct plasmid pSecTrypHis

&lt;400&gt; 7

aagcttggct agcaacacca tgaatctact cctgatacctt acctttgttg ctgctgctgt 60  
tgctgcccc tttgacgacg atgacaagga tccgaattc 99

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 99

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed oligonucleotide to construct plasmid pSecTrypHis

&lt;400&gt; 8

gaattcggat ccttgatcat gtcgtcaaag ggggcagcaa cagcagcagc aacaaaggta 60  
aggatcagga gtagattcat ggtgttgcta gccaaagctt 99

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 15

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



13/24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify neurosin-encoding sequence

&lt;400&gt; 9

ttggtgcatg gcgga

15

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify neurosin-encoding sequence

&lt;400&gt; 10

tcctcgagac ttggcctgaa tggtttt

27

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pSecTrypHis/Neurosin

&lt;400&gt; 11

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

14/24

gcgctagcag atctccatga atctactcct gatcc

35

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid  
pSecTrypHis/Neurosin

&lt;400&gt; 12

tgaagcttgc catggaccaa cttgtcatc

29

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid  
pTrypHis

&lt;400&gt; 13

ccaagcttca ccatcaccat caccat

26

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pTrypSigTag

<400> 14

gcacagtcga ggctgat

17

<210> 15

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pFBTrypSigTag

<400> 15

caaatgtggt atggctg

17

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify active hBSSP6-encoding sequence

<400> 16

atcatcaagg gttatgagtg

20

<210> 17

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify active hBSSP6-encoding sequence

<400> 17

cggaattcgc attaagaaga gggttgag

28

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6F1 for RACE for human BSSP6 (forward)

<400> 18

tcaagccccg ctacatagtt

20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6F2 for RACE for human BSSP6 (forward)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



<400> 19

atcatgctgg tgaagatggc

20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6F3 to amplify full-length human brain BSSP6-encoding mRNA (forward)

<400> 20

ggactcaaga gaggaacctg

20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6F4 to amplify mature human BSSP6-encoding region (forward)

<400> 21

atcatcaagg ggttcgagtg

20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6F5 to amplify full-length human prostate BSSP6-encoding mRNA (forward)

<400> 22

ctgccttgct ccacacctgg

20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6R1 for RACE for human BSSP6 (reverse)

<400> 23

ttctcacact tctggtgctc

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6R2 for RACE for human BSSP6 (reverse)

<400> 24

atggtgtctg tgatgttgcc

20

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

19/24

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6R3/P to  
amplify full-length human BSSP6-encoding mRNA (reverse)

&lt;400&gt; 25

aactgcagga accaaacacc aagtgg

26

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP6F1 for RACE  
for mouse BSSP6 (forward)

&lt;400&gt; 26

cgacttcaac aacagcctcc

20

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP6F2 for RACE  
for mouse BSSP6 (forward)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<400> 27

cttcctttacc cgagctgtgc

20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP6F3 to amplify full-length mouse prostate BSSP6-encoding mRNA (forward)

<400> 28

taagctagga gaactgaggc

20

<210> 29

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP6F4 to amplify mature mouse BSSP6-encoding region (forward)

<400> 29

atcaagggtt atgagtgc

18

<210> 30

<211> 19

<212> DNA

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP6F5 to amplify full-length mouse brain BSSP6-encoding mRNA (forward)

<400> 30

cttacaggct tggggattg

19

<210> 31

<211>

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> 20

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP6R1 for RACE for mouse BSSP6 (reverse)

<400> 31

gatgatgcct tgaagagatc

20

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP6R2 for RACE for mouse BSSP6 (reverse)

<400> 32

catggtgtct gtgatgttgc c

21

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<210> 33

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP6R3/E to amplify full-length mouse BSSP6-encoding mRNA (reverse)

<400> 33

cggaattcgc attaagaaga gggtggag

28

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6R3 to amplify a portion of BSSP6 variant type-encoding mRNA from human prostatic cancer cell line PC-3 (reverse)

<400> 34

atggtgtctg tgatgttgcc

20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP6F7 to amplify a portion of human BSSP6-encoding mRNA (forward)

<400> 35

cctcaagccg tgggtgtcac

20

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify conserved region of serin proteases-encoding sequence

<220>

<221> UNSURE

<222> 9, 12

<223> n is a, c, g or t.

<400> 36

gtgctcacng cngcbcaytg

20

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify conserved region of serin proteases-encoding sequence

<220>

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<221> UNSURE

<222> 12, 15

<223> n is a, c, g or t.

<400> 37

ccvctrwsdc cncenggcga

20

<210> 38

<211> 117

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide to construct plasmid pTrypHis

<400> 38

AAGCTTGGCT AGCAACACCA TGAATCTACT CCTGATCCTT ACCTTTGTTG CTGCTGCTGT 60

TGCTGCCCCC TTTCACCATC ACCATCACCA TGACGACGAT GACAAGGATC CGAATTC 117

<210> 39

<211> 117

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide to construct plasmid pTrypHis

<400> 39

GAATTCGGAT CCTTGTCATC GTCGTCATGG TGATGGTGAT GGTGAAAGGG GGCAGCAACA 60

GCAGCAGCAA CAAAGGTAAG GATCAGGAGT AGATTCATGG TGTGCTAGC CAAGCTT 117

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06476

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, 9/64, 5/06, 1/21, C07K16/40,  
C12P21/08, A01K67/027, G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00-15/90, C12N9/00-9/99

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GENBANK/EMBL/DDBJ/GENESEQ  
SWISSPROT/PIR/GENESEQ  
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Biochimica et Biophysica Acta, 1399, Aug. 20, 1998 Shigetaka Yoshida et al., "cDNA cloning and expression of a novel serine protease, TLSP", p.225-228	1-12, 17, 18, 20-23, 25-36 13-16, 19, 24, 37 -41
X A	WO, 98/32865, A1 (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.), 30 July, 1998 (30.07.98), Full text; Figs. 1 to 5 & AU, 9860419, A & US, 5840871, A	1-12, 17, 18, 20-23, 25-37, 39 13-16, 19, 24, 38 , 40, 41
P, X P, A	WO, 99/49055, A1 (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.), 30 September, 1999 (30.09.99), Full text; Figs. 1 to 3 (Family: none)	1-12, 17, 18, 20-23, 25-36 13-16, 19, 24, 37 -41
P, X P, A	WO, 98/54963, A2 (HUMAN GENOME SCI. INC.), 10 December, 1998 (10.12.98), p.145-146, 441-442 & AU, 9878120, A	1-12, 17, 18, 20-23, 25-36 13-16, 19, 24, 37 -41

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing  
date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means  
"P" document published prior to the international filing date but later  
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or  
priority date and not in conflict with the application but cited to  
understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such  
combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
15 February, 2000 (15.02.00)

Date of mailing of the international search report  
07 March, 2000 (07.03.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06476

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X P, A	WO, 99/31236, A2 (GENSET.), 24 January, 1999 (24.01.99), p.412-413 & AU, 9915030, A	1-12, 17, 18, 20-23, 25-36 13-16, 19, 24, 37 -41
A	The Journal of Neuroscience, 15(7), July 1995 Zu-lin Chen et al., "Expression and activity-dependent changes of a novel limbic-serine protease gene in the hippocampus", p.5088-5097	1-41
A	Gene, 213, June 15, 1998 Shigetaka Yoshida et al., "Sequence analysis and expression of human neuropsin cDNA and gene", p.9-16	1-41

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/06476

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/12, 9/64, 5/06, 1/21, C07K16/40,  
C12P21/08, A01K67/027, G01N33/543

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/00-15/90, C12N9/00-9/99

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GENBANK/EMBL/DBJ/GENESEQ  
SWISSPROT/PIR/GENESEQ  
BIOSIS (DIALOG)、WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	Biochimica et Biophysica Acta, 1399, Aug. 20, 1998 Shigetaka Yoshida et al., "cDNA cloning and expression of a novel serine protease, TLSP", p. 225-228	1-12, 17, 18, 20-23, 25-36 13-16, 19, 24, 37-41
X A	WO, 98/32865, A1 (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.) 30. 7月. 1998 (30. 07. 98) 全文, 第1-5図 &AU, 9860419, A &US, 5840871, A	1-12, 17, 18, 20-23, 25-37, 39 13-16, 19, 24, 38, 40, 41

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15. 02. 00

国際調査報告の発送日

07.03.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生

印

4B

9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X P, A	WO, 99/49055, A1 (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.) 30. 9月. 1999 (30. 09. 99) 全文, 第1-3図 (ファミリーなし)	1-12, 17, 18, 20-23, 25-36 13-16, 19, 24, 37-41
P, X P, A	WO, 98/54963, A2 (HUMAN GENOME SCI. INC.) 10. 12月. 1998 (10. 12. 98) p. 145-146, 441-442 & AU, 9878120, A	1-12, 17, 18, 20-23, 25-36 13-16, 19, 24, 37-41
P, X P, A	WO, 99/31236, A2 (GENSET.) 24. 1月. 1999 (24. 01. 99) p. 412-413 & AU, 9915030, A	1-12, 17, 18, 20-23, 25-36 13-16, 19, 24, 37-41
A	The Journal of Neuroscience, 15(7), July 1995 Zu-lin Chen et al., "Expression and activity-dependent changes of a novel limbic-serine protease gene in the hippocampus", p. 5088-5097	1-41
A	Gene, 213, June 15, 1998 Shigetaka Yoshida et al., "Sequence analysis and expression of human neuropsin cDNA and gene", p. 9-16	1-41